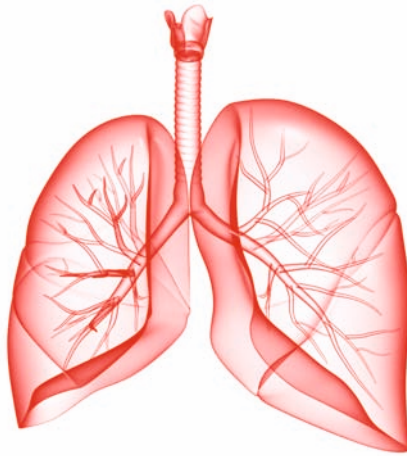


Experimentelle Untersuchungen zum pulmonalen Hochdruck:
Die Bedeutung der Hypoxie-induzierbaren Faktoren
für pulmonalvaskuläre Remodellingprozesse
in pulmonalarteriellen Fibroblasten

Bastian Georg Karl Eul



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Experimentelle Untersuchungen zum pulmonalen Hochdruck:
Die Bedeutung der Hypoxie-induzierbaren Faktoren
für pulmonalvaskuläre Remodellingprozesse
in pulmonalarteriellen Fibroblasten**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Bastian Georg Karl Eul

aus Emmerich

Gießen 2012

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin,

Medizinische Klinik und Poliklinik II

der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen,

Leiter: Prof. Dr. W. Seeger

und

Medizinische Klinik IV und V,

der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen,

Leiter: Prof. Dr. Dr. F. Grimminger

Gutachter: PD Dr. Hänze

Gutachter: Prof. Dr. Schulz

Tag der Disputation: 26.11.2013

In Liebe und Dankbarkeit

meinen Eltern, Winfried und Renate Eul

mit meinem Bruder Alexander,

meinen Großeltern Karl und Dorothea Bettray und Georg und Adele Eul

und meiner Frau Inger Eul.



„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Bastian Georg Karl Eul

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
1. VORWORT	4
2 EINLEITUNG	7
2.1 Die Pulmonale Strombahn – Besonderheiten und Unterschiede zum systemischen Kreislauf	7
2.1.1 Übersicht über den Aufbau der pulmonalen Strombahn	7
2.1.2 Struktureller Wandaufbau der Pulmonalarterien	8
2.1.3 Physiologie der pulmonalen Zirkulation	8
2.1.4 Der Euler Liljestrand-Mechanismus: die hypoxische Vasokonstriktion	9
2.2 Die vaskuläre Dysfunktion der pulmonalen Hypertonie (PH)	9
2.2.1 Definition und Klassifikation der pulmonalen Hypertonie	9
2.2.2 Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie	12
2.2.3 Vaskuläre Remodellingprozesse im Rahmen der pulmonalen Hypertonie	12
2.3 Hypoxie induziertes pulmonalvaskuläres Remodelling	13
2.3.1 Morphologische Veränderungen der Pulmonalarterien in Hypoxie	14
2.3.2 Zelltyp spezifische Veränderungen durch Hypoxie	14
2.3.2.1 Pulmonalarterielle Endothelzellen	14
2.3.2.2 Pulmonalarterielle glatte Muskelzellen	15
2.3.2.3 Pulmonalarterielle Fibroblasten	15
2.4 Die Hypoxie-induzierbaren Faktoren	16
2.4.1 Einleitung	16
2.4.2 Die Struktur von HIF	17
2.4.3 Regulation der Hypoxie induzierbaren Faktoren	18
2.4.3.1 Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α	18
2.4.3.2 Sauerstoffabhängige Prolin Hydroxylierung	18
2.4.3.3 Transkriptionelle Aktivierung durch HIF-1 α und HIF-2 α	19
2.4.3.4 Andere Regulationsmechanismen	19
2.4.4 Transkription Hypoxie induzierbarer Gene durch HIF	21
2.4.5 Die Hypoxie-induzierbaren Faktoren im vaskulären Remodelling	23
2.5 RNA Interferenz	26
2.6 Fragestellung	29
3. MATERIAL UND METHODEN	31
3.1 Zellkultur	31
3.1.1 Zellkultur der A549 Zellen	31
3.1.2 Transfektion der A549 Zellen	31
3.1.3 Die stabile Transfektion	32
3.1.4 Isolation von primären humanen pulmonalarteriellen Fibroblasten	32
3.1.5 Identifikation der Reinheit der Primärkultur	33
3.1.6 Transfektion der primären humanen pulmonalarteriellen Fibroblasten	34
3.1.7 Die Kultivierung unter Normoxie und Hypoxie	35
3.2 Zellphysiologische Untersuchungen	35
3.2.1 Untersuchungen der Proliferation	35
3.2.1.1 Zellzyklus-Analyse	35
3.2.1.2 5-Bromodeoxyuridin (BrdU)- Assay	36
3.2.1.3 [3H]Thymidin-Assay	36
3.2.1.4 Zellzählung	37

3.2.2	Apoptose Assay	37
3.2.3	Migrations-Assay	38
3.3	Molekularbiologische Methoden	39
3.3.1	Verwendete Plasmide	39
3.3.2	siRNA	39
3.3.3	Luciferase Detektion	40
3.3.3.1	Luciferase-Reporter Messung	40
3.3.3.2	Hypoxie-responsives Element Reporter-Gen Assay	40
3.3.3.3	Immunzytofluoreszenz	41
3.3.4	<i>Real time</i> Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
3.3.4.1	RNA Isolation	42
3.3.4.2	Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit	42
3.3.4.3	Herstellung der cDNA	43
3.3.4.4	Durchführung der <i>real time</i> PCR	43
3.3.5	Proteinanalytik	45
3.3.5.1	Proteinisolierung	45
3.3.5.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
3.3.5.3	Elektroblotting	46
3.3.5.4	Immunologische Darstellung der Proteine	46
3.3.5.5	Immunzytofluoreszenz	47
3.4	Liste verwendeter Substanzen	48
3.4.1	Experimentelle Agenzien und Lösungsmittel	48
3.5	Statistische Auswertung	50
4	ERGEBNISSE	51
4.1	Übersicht	51
4.2	Etablierung der siRNA Technik an A549 Zellen	53
4.2.1	Anwendung von siRNA gerichtet gegen Luciferase an Luciferase exprimierenden A549 Zellen	53
4.3	Inhibition von HIF-1α an A549 Zellen	53
4.3.1	Nachweis der Inhibition von HIF-1 α	53
4.3.2	Auswirkungen der Inhibition von HIF-1 α auf die Proliferation von A549 Zellen unter Hypoxie	57
4.4	Die Rolle der Hypoxie-induzierbaren Faktoren in pulmonalerteriellen Fibroblasten	61
4.4.1	Physiologische Reaktion pulmonalerterieller Fibroblasten auf Hypoxie	61
4.4.2	Expression von HIF-1 α und HIF-2 α in PA-FB	66
4.4.3	siRNA gegen HIF-1 α und HIF-2 α in PA-FB	68
4.4.4	Einfluss der Inhibition von HIF-1 α und HIF-2 α auf die Hypoxie induzierte physiologische Reaktion PA-FB	71
5.	DISKUSSION	74
5.1	Ableitung der Arbeitshypothese	74
5.2	Anwendung der siRNA zur Inhibition von Genen	74
5.2.1	Etablierung der siRNA Technik	75
5.3	Die Rolle von HIF-1α in der humanen Adenokarzinomzelllinie A549	76
5.3.1	HIF-1 α -Expression und HIF-1 α Inhibition	76
5.3.2	HIF-1 α in der Zellzyklusregulation	77

5.4	Hypoxie im vaskulären Remodelling von pulmonalarteriellen Fibroblasten	78
5.4.1	Auswirkungen von Hypoxie auf pulmonalarterielle Fibroblasten	78
5.4.2	Die Hypoxie-induzierbaren Faktoren in pulmonalarteriellen Fibroblasten	80
5.4.3	Die Rolle der Hypoxie-induzierbaren Faktoren im vaskulären Remodelling pulmonalarterieller Fibroblasten.....	81
5.5	Diskussion der Befunde im aktuellen Kontext der Literatur	85
5.6	Perspektiven und weiterführende Experimente.....	88
6.	ZUSAMMENFASSUNG	91
7.	SUMMARY	92
8.	LITERATURVERZEICHNIS.....	93
9.	ANHANG.....	105
9.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	105
9.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	108
9.3	TABELLENVERZEICHNIS.....	109
9.4	LEBENS LAUF.....	110
9.5	EIGENE ORIGINALARBEITEN	111
9.6	KONGRESSBEITRÄGE	112
9.7	DANKSAGUNG	113

1. VORWORT

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2001 bis Oktober 2007 am Zentrum für Innere Medizin im experimentellen Laborbereich von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Friedrich Grimminger (Medizinische Klinik IV und V) und Herrn Prof. Dr. med. Werner Seeger (Medizinische Klinik II) unter Betreuung von Herrn PD Dr. rer. nat. Jörg Hänze in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. Frank Rose. Die Untersuchungen wurden zum Teil im Rahmen eines Forschungsstipendiums im internationalen Graduiertenprogramm "Molecular Biology and Medicine of the Lung" der Justus Liebig Universität Giessen durchgeführt.

Schwerpunkt meiner wissenschaftlichen Tätigkeit bildete die Analyse der vaskulären Umbauprozesse (das sogenannte „Remodelling“) im Krankheitsbild der Pulmonalen Hypertonie. In der vorliegenden Arbeit untersuchte ich den Einfluss der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) auf Proliferation, Apoptose, Migration und Transdifferenzierung von pulmonalarteriellen Fibroblasten. Der unterschiedliche Einfluss der beiden HIF Isoformen, HIF-1 α und HIF-2 α , wurde durch die Etablierung und Anwendung der spezifischen Gen-Inhibition mittels RNA-Interferenz analysiert. Ich analysierte pulmonalarterielle Fibroblasten hinsichtlich:

- a) der zellphysiologischen Reaktionen auf Hypoxie
- b) die Effizienz und Spezifität von RNA-Interferenz zur Inhibition der Hypoxie-induzierten-Faktoren (HIF)
- c) sowie den Einfluss der Inhibition der Transkriptionsfaktoren HIF auf das vaskuläre Remodelling fokussiert auf pulmonalarterielle Fibroblasten.

Zu diesem Zweck etablierte ich zunächst die spezifische Inhibition von HIF an einer Modell-Zelllinie, um die ermittelten Daten danach in die primäre Zellkultur zu übertragen. Die physiologische Konsequenz der Inhibition von HIF-1 α oder HIF-2 α konnte somit getrennt voneinander betrachtet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden in den folgenden internationalen Fachzeitschriften publiziert:

- 1) Hanze, J., **B. G. Eul**, R. Savai, S. Krick, P. Goyal, F. Grimminger, W. Seeger, and F. Rose. RNA interference for HIF-1 α inhibits its downstream signalling and affects cellular proliferation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 312:571-577. 2003.
 - 2) Krick, S., J. Hanze, **B. Eul**, R. Savai, U. Seay, F. Grimminger, J. Lohmeyer, W. Klepetko, W. Seeger, and F. Rose. Hypoxia-driven proliferation of human pulmonary artery fibroblasts: cross-talk between HIF-1 α and an autocrine angiotensin system. *FASEB J.* 19:857-859. 2005.
-

- 3) Krick, S., **B. G. Eul**, J. Hanze, R. Savai, F. Grimminger, W. Seeger, and F. Rose. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 32:395-403. 2005.
- 4) **Eul, B.**, F. Rose, S. Krick, R. Savai, P. Goyal, W. Klepetko, F. Grimminger, N. Weissmann, W. Seeger and J. Hanze. Impact of HIF-1alpha and HIF-2alpha on proliferation and migration of human pulmonary artery fibroblasts in hypoxia. *FASEB J.* 20:163-165. 2006

Über das eigentliche Promotionsthema wurden weitere Analysen von Hypoxie im vaskulären Remodelling an unterschiedlichen Zellmodellen durchgeführt. Neben den Arbeiten an Zellmodellen stand die HIF Inhibition in vivo im Mittelpunkt von weiteren durchgeführten Projekten. Ein Schwerpunkt dieser weiterführenden Arbeiten war die Etablierung der siRNA Applikation in einem Mausmodell. Dabei standen die Transfektion der Lunge und die Erreichbarkeit von Bronchialkarzinomen in Vordergrund. Die dabei gewonnen Daten zeigten eine effiziente Transfektion vor allem des Bronchialkarzinoms. Die Ergebnisse dieser themenverwandten Arbeiten wurden in den folgenden internationalen Fachzeitschriften publiziert:

- 1) Olschewski, A., Y. Li, B. Tang, J. Hanze, **B. Eul**, R. M. Bohle, J. Wilhelm, R. E. Morty, M. E. Brau, E. K. Weir, G. Kwapiszewska, W. Klepetko, W. Seeger, and H. Olschewski.. Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ.Res.* 98:1072-1080. 2006
 - 2) Savai, R., J. C. Wolf, S. Greschus, **B. G. Eul**, R. T. Schermuly, J. Hanze, R. Voswinckel, A. C. Langheinrich, F. Grimminger, H. Traupe, W. Seeger, and F. Rose. Analysis of tumor vessel supply in Lewis lung carcinoma in mice by fluorescent microsphere distribution and imaging with micro- and flat-panel computed tomography. *Am.J.Pathol.* 167:937-946. 2005.
 - 3) Savai, R., R. T. Schermuly, R. Voswinckel, A. Renigunta, B. Reichmann, **B. Eul**, F. Grimminger, W. Seeger, F. Rose, and J. Hanze. HIF-1alpha attenuates tumor growth in spite of augmented vascularisation in an A549 adenocarcinoma mouse model. *Int.J.Oncol.* 27:393-400. 2005.
 - 4) Savai R, Wolf JC, Greschus S, **Eul BG**, Schermuly RT, Hänze J, Voswinckel R, Langheinrich AC, Grimminger F, Traupe H, Seeger W, Rose F. Analysis of tumor vessel supply in Lewis lung carcinoma in mice by fluorescent microsphere distribution
-

and imaging with micro- and flat-panel computed tomography. *Am J Pathol.* 2005 Oct;167(4):937-46.

- 5) Alexandre-Alcázar MA, Kwapiszewska G, Reiss I, Amarie OV, Marsh LM, Sevilla-Pérez J, Wygrecka M, **Eul B**, Köbrich S, Hesse M, Schermuly RT, Seeger W, Eickelberg O, Morty RE. Hyperoxia modulates TGF-beta/BMP signaling in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007 Feb;292(2):L537-49. Epub 2006 Oct 27.
 - 6) Königshoff M, Wilhelm A, Jahn A, Sedding D, Amarie OV, **Eul B**, Seeger W, Fink L, Günther A, Eickelberg O, Rose F. The angiotensin II receptor 2 is expressed and mediates angiotensin II signaling in lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007 Dec;37(6):640-50. Epub 2007 Jul 13.
-

2 EINLEITUNG

2.1 Die Pulmonale Strombahn – Besonderheiten und Unterschiede zum systemischen Kreislauf

2.1.1 Übersicht über den Aufbau der pulmonalen Strombahn

Der Lungenkreislauf ist ein Gefäßsystem zusammengesetzt aus Pulmonalarterien, Pulmonalvenen, dem verbindenden alveolären Kapillarnetz, dem rechten Ventrikel und dem linken Vorhof des Herzens. Diese Gefäße führen das Körperblut zum Gasaustausch durch die alveolären Kapillaren, um den großen Kreislauf mit Sauerstoff zu versorgen. Sie gehören somit zur Gruppe der Vasa publica. Neben diesem Gefäßsystem versorgen noch Bronchialarterien, die Vasa privata, die Lunge direkt mit sauerstoffreichem Blut. Pulmonalarterien sind physiologisch optimal an ihre Umgebungsbedingungen angepasst. Durch eine dünne Adventitia, bestehend aus pulmonalarteriellen Fibroblasten, sind sie in das peribronchiale Bindegewebe eingebettet. Dies ermöglicht eine Verschieblichkeit gegen Bronchien und Lungengewebe, wodurch Längenveränderungen bei Atembewegungen, aber auch stärkere Durchmesser-schwankungen bei Veränderungen des Herzzeitvolumens oder des Druckgradienten elastisch aufgefangen werden können (Benninghoff, 1994). Die ersten Äste der Pulmonalarterie sind vom elastischen Bautyp mit einer dünnen Wandstruktur. Diese besteht allerdings nicht wie in der Aorta aus elastischen Membranen, sondern aus kräftigen elastischen Fasergittern und mit glatter Muskulatur. Nach etwa sieben bis acht Aufteilungsgenerationen geht der elastische Typus in einen muskulären Bautyp mit einer kräftigen „Membrana elastica externa“ über. Die nachfolgenden Arteriolen besitzen nur noch spiralig angeordnete Muskelzellbündel mit intermediären breiten muskelfreien Streifen. Im Gegensatz zu den systemischen Arteriolen des Körperkreislaufs sind die Arteriolen der Lungenstrombahn bedingt durch den niedrigen Pulmonalarterien-Druck (PAP) keine typischen Widerstandsgefäße. Sie liegen bereits in den Inter-alveolarsepten zwischen den „Ductus alveolares“ und nehmen somit am Gasaustausch teil (Benninghoff, 1994). Anschließend folgen über muskelfreie Präkapillaren die 6-9 µm großen Alveolarkapillaren, die flächig engmaschige Netze mit ihren venösen Verbindungen bilden. Auf diese Weise ergibt sich eine funktionelle Kapillarstreckenlänge von circa 300-500 µm, die zur Oxygenierung des Blutes zur Verfügung steht (Lenfant, 1976).

2.1.2 Struktureller Wandaufbau der Pulmonalarterien

Wie jede Arterie bestehen die Pulmonalarterien prinzipiell aus drei Wandschichten:

- 1) der **Intima**, die inneren, dem Gefäßlumen zugewandten Seite, bestehend aus Endothelzellen
- 2) der **Media**, aus glatten Muskelzellen bestehend
- 3) der **Adventitia**, die äußere Schicht, bestehend aus pulmonalarteriellen Fibroblasten

Die Pulmonalarterien besitzen den beschriebenen Aufbau mit einer kontinuierlichen Media nur bis zu einer Lumenweite von 80 µm. Weiter distal sind nur noch teilweise muskularisierte Gefäße vorhanden. Die teilweise muskularisierten Gefäße weisen vielfach intermediäre Zellen mit morphologischen Charakteristika von Perizyten und glatten Muskelzellen auf (Davies et al., 1986).

2.1.3 Physiologie der pulmonalen Zirkulation

Im Unterschied zum Körperkreislauf, der das Herzschlagvolumen auf die parallel geschalteten Gefäßsysteme seiner verschiedenen Organe in sehr variabler Weise verteilen kann, muss der Lungenkreislauf stets das gesamte Schlagvolumen des rechten Herzens aufnehmen. Dementsprechend beträgt der Strömungswiderstand in der pulmonalen Strombahn durch seine kurze Gefäßstrecke und den großen Gesamtquerschnitt nur etwa $\frac{1}{10}$ des Gesamtwiderstandes der Körpergefäße. Aus diesem Grund gehört der Lungenkreislauf neben den Körpervenen und dem rechten Vorhof zum Niederdrucksystem des Kreislaufs.

Der pulmonalarterielle Mitteldruck (PAMP) setzt sich zusammen aus der Summe von linksatrialem Druck und dem Druckabfall über die Gefäßwiderstände der arteriellen, kapillären und venösen Strecke des Pulmonalstromgebietes. Der systolische Druck in den Lungenarterien beträgt beim gesunden Erwachsenen im Durchschnitt 2,9 kPa (ca. 22 mmHg), der diastolische Druck 1,0 kPa (ca. 8 mmHg), woraus ein PAMP von 1,7 kPa (ca. 13 mmHg) resultiert, der in den Alveolarkapillaren auf 0,9 kPa (ca. 7 mmHg) abfällt (Benninghoff, 1994). Die Struktur der Alveolarwände und deren Funktionstüchtigkeit für einen adäquaten Gasaustausch sind hierbei wesentlich abhängig von den niedrigen Druckverhältnissen. Die pulmonale Strombahn besitzt weiterhin, vergleichbar mit den Körpervenen, die Kapazität, größere Blutvolumina aufzunehmen und abzugeben. Dies ist möglich ohne die Gasaustauschfunktion zu beeinträchtigen. Die so genannte „funktionelle Kreislauf - Reserve“ des Niederdrucksystems erleichtert somit die Anpassung des Lungenkreislaufs an den Körperkreislauf (Crystal et al., 1991). Bei steigendem Blutfluss durch z. B. körperliche Belastung wird der Druck also annähernd konstant gehalten. Voraussetzung ist eine aktive

Vasodilatation, die entweder eine autonome regulatorische Leistung der Lungengefäße darstellt oder durch Stellreaktionen des Kreislaufzentrums zustande kommt. Die Druckhomöostase wird dadurch unterstützt, dass es zu einer zusätzlichen Durchblutung, dem sogenannten „*recruitment*“, wenig perfundierter Gefäße kommt.

2.1.4 Der Euler Liljestrand-Mechanismus: die hypoxische Vasokonstriktion

Der größte und bedeutendste Unterschied in der Regulation des pulmonalen Blutflusses im Vergleich zum systemischen besteht in der „hypoxischen Vasokonstriktion (HPV)“. Die hypoxische Vasokonstriktion stellt eine autonome Leistung der pulmonalen Strombahn dar und steht im Gegensatz zur Vasodilatation als hypoxische Antwort des systemischen Kreislaufs. Euler und Liljestrand gelten als Begründer der wissenschaftlichen Erforschung dieses Mechanismus und gaben ihm seinen Namen, obwohl es schon 1894 Bradford und Dean gelang die hypoxische Vasokonstriktion zu beobachten und zu beschreiben (Bradford and Dean, 1894; Euler and Liljestrand, 1946). Durch diesen elementaren physiologischen Mechanismus wird die Durchblutung von Lungengebieten, in denen aufgrund eines niedrigen Sauerstoffpartialdruckes kein effektiver Gasaustausch zu erwarten wäre, gedrosselt. Der regionale pulmonale Blutfluss wird auf diese Weise der lokalen alveolären Ventilation angepasst. Die HPV setzt sich zusammen aus einer sehr schnellen Komponente, die innerhalb von sieben Sekunden einsetzt, und einer darauf folgenden langsamen Komponente, welche eine Veränderung der Genexpression in den Gefäßzellen gekennzeichnet ist (Jensen et al., 1992). Weiterhin wird die hypoxische Vasokonstriktion durch direkte Modulation von Kaliumkanälen in den glatten Muskelzellen beeinflusst. Durch eine Kaliumkanalhemmung wird eine Membrandepolarisation induziert mit folgendem zellulären Kalziumeinstrom. Dadurch kommt es zu einer Vasokonstriktion. Hypoxie gilt hierbei als einer der Auslösemechanismen (Post et al., 1992). Kommt es durch bestimmte Umstände zu einer chronischen Hypoxie im alveolären Stromgebiet, so führt der beschriebene Euler-Liljestrand-Mechanismus zum Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks. Hierbei sind allerdings die zugrunde liegenden Pathomechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt.

2.2 Die vaskuläre Dysfunktion der pulmonalen Hypertonie (PH)

2.2.1 Definition und Klassifikation der pulmonalen Hypertonie

Die schwere pulmonale Hypertonie ist eine Erkrankung, die die körperliche Leistungsfähigkeit stark reduziert und die Lebenserwartung einschränkt. Zudem ist sie die häufigste Ursache des Rechtsherzversagens. Bei der primären PH beträgt die Lebenserwartung unbehandelt nach Diagnosestellung etwa 2,8 Jahre. Man unterscheidet

verschiedene Schweregrade der pulmonalen Hypertonie, die sich in ihrer Einteilung hauptsächlich an dem Maß der pulmonalarteriellen Mitteldruckerhöhung orientieren. Bei der PH Grad I wird der physiologische Druck von 20 mmHg nur unter Belastung überschritten, während es bei Grad III, der sogenannten schweren pulmonalen Hypertonie, zu einer konstanten Druckerhöhung von 30 mmHg kommt, die bei dekompensierten Lungenkranken bis hin zu 120 mmHg ansteigen kann (Olschewski and Seeger, 2000). Ätiologisch können der pulmonalen Hypertonie eine Vielfalt von Ursachen zugrunde liegen. Hierbei unterscheidet man nach der alten Klassifikation eine primäre und eine sekundäre pulmonale Hypertonie, wobei primär bedeutet, dass kein plausibler Auslöser der Krankheit vorliegt. Die Einteilung in primär und sekundär wurde im Jahre 2003 von einer funktionellen Klassifikation, der sogenannten Venedig Klassifikation, abgelöst. Diese Nomenklatur definiert die erste Gruppe als die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH), mit der idiopathischen (IPAH) der familiären (FPAH) und der PAH assoziiert mit anderen Erkrankungen oder Medikamenteneinnahmen. Weiterhin gehören die PAH mit relevanter venöser oder kapillärer Beteiligung und die persistierende pulmonalarterielle Hypertonie des Neugeborenen in die erste Gruppe der PH. Eine weitere Unterteilung ergibt die Gruppe der pulmonalen Hypertonie (PH) bei Erkrankungen des linken Herzens, bei Lungenerkrankung und/oder Hypoxie aufgrund chronischer Thrombembolien und die PH mit verschiedenen Ursachen.

Bei der idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie (IPAH), ehemals die primäre pulmonale Hypertonie (PPH), existiert eine genetische Disposition, die dann anzunehmen ist, wenn kein Auslöser vorliegt oder dieser relativ schwach ist (Appetitzüglers, Leberzirrhose, Virusinfekt). Erst kürzlich wurde bei dieser familiären Form ein Gendefekt des „Bone Morphogenic Protein“ - Rezeptors (BMPR) auf Chromosom 2q31-32 lokalisiert, welcher überhäufig bei PPH Patienten vorliegt (Deng et al., 2000; McCarthy, 2000). Weiterhin fand man bei der IPAH eine diesem Krankheitsbild eigene Endothelzellproliferation monoklonaler Genese, im Gegensatz zu der in der sekundären pulmonalen Hypertonie auftretenden Endothelzellproliferation polyklonalen Ursprungs (Lee et al., 1998). Die anderen erworbenen Formen der pulmonalen Hypertonie entwickeln sich als Folgeerkrankung verschiedener vaskulärer Krankheiten:

- die primäre Obliteration im Rahmen von Lungenembolien,
 - die mechanische Belastung durch Herzvitien,
 - die Inflammation, die bei Kollagenosen und entzündlichen Lungenkrankheiten eine bedeutende Rolle spielt,
-

- die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion, die bei atmosphärischer Hypoxie sowie alveolärer Hypoventilation auftritt.

Die Venedig Klassifikation der pulmonalen Hypertonie wurde im Jahre 2008 erweitert und spezifiziert (Simonneau 2009; Galiè 2009). Die sogenannte Dana Klassifikation hat aktuell Gültigkeit und unterteilt die Erkrankung in fünf Gruppen. Die pulmonalarterielle Hypertonie, die pulmonale Hypertonie bei Erkrankungen des linken Herzens, die pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie, die pulmonale Hypertonie aufgrund chronischer Thrombembolien und die pulmonale Hypertonie mit unklaren multifaktoriellen Mechanismen (Simonneau 2009; Galiè 2009). In Tabelle 1 ist die Klassifikation mit allen Unterpunkten detailliert aufgeführt.

1) Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)
<ol style="list-style-type: none"> 1. Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie (IPAH) 2. Familiäre pulmonalarterielle Hypertonie (FPAH) <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>BMPR2</i> 2. <i>ALK1, Endoglin (mit oder ohne hereditärer hämorrhagischer Teleangiectasie)</i> 3. <i>Unbekannt</i> 3. Arzneimittel- und Toxin- induziert 4. Assoziierte Pulmonalarterielle Hypertonie (APAH); bei: <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Kollagenosen</i> 2. <i>HIV-Infektion</i> 3. <i>Portale Hypertonie</i> 4. <i>Angeborene systemisch-pulmonalen Shunts (u. a. Herzfehler)</i> 5. <i>Bilharziose</i> 6. <i>Chronisch hämolytische Anämie</i> 5. Persistierende pulmonalarterielle Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)
1') Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD für engl. pulmonary veno-occlusive disease) und/oder pulmonal kapilläre Hämangiomatose (PCH)
2) Pulmonale Hypertonie bei Erkrankungen des linken Herzens
<ol style="list-style-type: none"> 1. Systolische Dysfunktion 2. Diastolische Dysfunktion 3. Herzklappenerkrankungen (Mitral- oder Aortenklappenfehler)
3) Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankung und/oder Hypoxie
<ol style="list-style-type: none"> 1. Chronisch obstruktive Lungenerkrankung 2. Interstitielle Lungenerkrankung 3. andere restriktiv und obstruktiv gemischte pulmonale Erkrankungen 4. Schlafapnoe-Syndrom 5. Alveolärer Hypoventilation 6. Chronische Höhenkrankheit 7. Anlagebedingte Fehlbildungen
4) Pulmonale Hypertonie aufgrund chronischer Thrombembolien (CTEPH)
5) Pulmonale Hypertonie mit unklaren multifaktoriellen Mechanismen
<ol style="list-style-type: none"> 1. Hämatologische Erkrankungen: Myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie 2. Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonare Langerhanszellenhistiozytose, Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitis 3. Metabolische Erkrankungen: Glykogenspeicherkrankheit, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen 4. Andere: Obstruktion durch Tumore, fibrosierende Mediastinitis, chronischer Nierenausfall mit Dialyse

Tabelle 1: Dana Klassifikation 2008

Modifiziert nach Simonneau 2009; Galiè 2009

2.2.2 Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie

Pathophysiologisch kann die pulmonale Hypertonie beruhen auf:

- einer Querschnittsverlegung (Obliteration),
- einem Gefäßverlust (Rarefaktion),
- einer Abnahme der Gefäßelastizität oder
- einer persistierenden aktiven Vasokonstriktion.

Diese Mechanismen bedingen in der Frühphase eine Abnahme der funktionellen Gefäßreserven und damit des Gefäßrekrutments unter Belastung. Später dann eine Beeinträchtigung der Lungenperfusion bereits in Ruhe. Ein eingeschränkter aktiver Vasodilationsmechanismus durch endotheliale Dysfunktion bzw. eine Vasokonstriktion durch inflammatorische Mediatoren überlagert meist die mechanischen Gefäßschäden. Als pathomorphologisches Substrat findet sich bei chronisch persistierender pulmonaler Hypertonie eine zunehmende Fixierung der vaskulären Widerstandserhöhung durch quantitative und qualitative Umstrukturierung der Gefäßwände (vaskuläres Remodelling) (Fishman, 1998; Stenmark and Mecham, 1997). Weiterhin scheint in den pathologisch veränderten Lungengefäßen der Mechanismus der Gefäßobliteration durch lokale Thrombozytenaktivierung und „in situ Thrombose“ verstärkt zu werden (Wagenvoort, 1960). Die entstehende pulmonale Hypertonie führt letztendlich zur chronischen Überlastung der rechten Herzkammer mit Entwicklung eines „Cor pulmonale“.

2.2.3 Vaskuläre Remodellingprozesse im Rahmen der pulmonalen Hypertonie

Die strukturellen Umbauprozesse, die der Entwicklung der pulmonalen Hypertonie zugrunde liegen, subsumieren sich unter dem Begriff des vaskulären Remodellings, wobei sich alle drei Wandschichten der Pulmonalarterien in charakteristischer Weise verändern.

Durch die chronisch alveoläre Hypoxie kommt es beim Remodelling der Gefäßwand zu einer:

- Intimafibrose, einer
- Hyperplasie der Media und zur
- Hyperplasie der Adventitia.

Die Intimafibrose erklärt sich durch Einwachsen von sogenannten Myofibroblasten in die subendotheliale Schicht der charakteristisch fragmentierten *Elastica interna*. Diese Myofibroblasten können sowohl von den ortsständigen intermediären Zellen, von eingewanderten glattmuskulären Zellen, als auch von Fibroblasten abstammen (Stenmark and Mecham, 1997). Als weiteres Kennzeichen wird eine „de novo Muskularisierung“

beschrieben. Es kommt dabei zu einem distalen Auswachsen von glatten Muskelzellen der Media, so dass auch kleinere, ehemals nur partiell muskularisierte Gefäße, eine komplette Muskularis aufweisen können (Durmowicz and Stenmark, 1999). Durch diese Veränderungen wird deutlich, dass den glatten Muskelzellen und den Fibroblasten eine zentrale Rolle im Prozess des vaskulären Remodellings zukommt.

In unserem Körper besteht auf zellulärer Ebene zumeist ein Gleichgewicht zwischen Wachstum und Differenzierung einerseits und dem programmierten Zelltod, der Apoptose, andererseits. Die Anzahl der neu produzierten Zellen entspricht genau der Anzahl der abgebauten Zellen. Dabei gibt es Zellen mit einer kontinuierlich hohen Proliferationsrate, wie z.B. das Dünndarmepithel, das wie die Epidermis innerhalb weniger Tage vollständig regeneriert wird, aber auch Zellverbände mit einer nur zeitweilig hohen Proliferationsrate, wie Fibroblasten, glatte Muskelzellen oder Endothelzellen. Diese werden erst bei Verletzungen oder sonstigen Stresszuständen aktiv und ersetzen dann zugrunde gegangene Zellen. Die Anpassung des Zellverlusts an eine entsprechende Zellproliferation ist ein fein und komplex regulierter Mechanismus mit zum Teil noch unbekannten Einflussfaktoren. Untersuchungen zur Pathogenese der pulmonalen Hypertonie veranschaulichen die leichte Störanfälligkeit dieses Gleichgewichts, welches über mehrere Stufen auf RNA, DNA- und Proteinebene reguliert wird.

2.3 Hypoxie induziertes pulmonalvaskuläres Remodelling

Die Grundidee, dass Hypoxie allein pulmonale Hypertonie und damit strukturelle Veränderungen der Pulmonalarterien verursachen kann, wird unterstützt durch die Beobachtung von Menschen, die in großer Höhe leben. Diese Gruppe hat eine chronische Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes, der nur in einem geringen Ausmaß durch die Gabe von Sauerstoff reversibel ist (Arias-Stella and Saldana, 1963). Darüber hinaus reagieren die Bewohner von großen Höhen mit einem wesentlich stärkeren Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes unter Belastung, als die Vergleichsgruppen (Arias-Stella and Saldana, 1963). Morphologisch findet sich dann in den Lungen eine erhöhte Expression von *alpha-smooth-muscle-cell* Aktin (α SMA). Diese α SMA Expression gilt als Gradmesser für die Muskularisierung in den kleinen Pulmonalarterien, die normalerweise nur sehr wenig muskularisiert sind. Die größeren und weiter proximalen Arterien weisen eine verdickte Media und Adventitia auf, was ein weiteres Charakteristikum des Hypoxie-induzierten vaskulären Remodellings ist.

2.3.1 Morphologische Veränderungen der Pulmonalarterien in Hypoxie

Die Pulmonalarterie besteht aus drei Schichten, der Intima mit Endothelzellen, der Media mit ihren glatten Muskelzellen und der Adventitia mit den pulmonalarteriellen Fibroblasten (PA-FB). Hypoxie verursacht eine Vielzahl von strukturellen Veränderungen der Pulmonalarterien, die zur der Entwicklung der pulmonalen Hypertonie beitragen. Zu diesen strukturellen Veränderungen gehört das Erscheinen von glatten Muskelzellen ähnelnden Zellen (*SM-like* Zellen), in Gefäßen, wo vorher eine Muskularisierung fehlte. Diese Zellen werden durch die Expression von *alpha-smooth-muscle-cell* Aktin (α SMA) definiert. Dieser Anstieg von α SMA wird auch als distale Ausbreitung von glatten Muskelzellen bezeichnet (zur Übersicht Stenmark et al., 2006). Darüber hinaus findet sich in den muskularisierten und elastischen Gefäßen eine Verdickung der Media und der Adventitia. Die Verdickung der Media wird dabei auf eine Hypertrophie, eine vermehrte Ansammlung von glatten Muskelzellen und eine gesteigerte Ansammlung von extrazellulären Matrixproteinen, hauptsächlich Kollagen und Elastin, zurückgeführt. Die Reaktion der Adventitia hingegen beruht auf einer Vermehrung von Fibroblasten und Myofibroblasten mit gesteigerter Ansammlung von extrazellulären Matrixproteinen, wie Kollagen, Elastin und Fibronektin (Stenmark et al., 2006). Die morphologischen Veränderungen der Intima unter Hypoxie sind noch nicht eindeutig belegt. Studien an neugeborenen Kälbern konnten jedoch eine Verdickung der Intima in der Hypoxie Gruppe mit einem erhöhten pulmonal arteriellen Druck nachweisen (Stenmark et al., 2006).

2.3.2 Zelltyp spezifische Veränderungen durch Hypoxie

2.3.2.1 Pulmonalarterielle Endothelzellen

Wie oben bereits erwähnt, führt chronische Hypoxie zu einer Verdickung der Intima bedingt durch Hypertrophie und Hyperplasie der Endothelzellen (Belknap et al., 1997; Stenmark and Mecham, 1997). Diese hypoxischen Endothelzellen produzieren dann vermehrt Laminin, Fibronektin und Elastin, was wieder Auswirkungen auf die Endothelzellen selber und auf die benachbarten Zelltypen hat (Botto et al., 2006). Diese Anpassungsvorgänge der Endothelzellen gehen mit physiologischen und metabolischen Veränderungen einher. So führt Hypoxie zu einer Reduktion der antithrombotischen Eigenschaften, einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität, sowie zu einer vermehrten Sekretion von Wachstumshormonen (Stenmark et al., 2006; Botto et al., 2006). Dies zeigt, dass Endothelzellen ein direktes Ziel der Hypoxie sind, gekennzeichnet durch Veränderungen der Permeabilität, Koagulation, Inflammation und Proteinsynthese (Botto et al., 2006). Die Auswirkungen können dann wieder autokrin die Endothelzellen selber, wie auch parakrin die benachbarten glatten

Muskelzellen und Fibroblasten beeinflussen und somit zu den chronischen Veränderungen der pulmonalen Hypertonie unter Hypoxie beitragen.(Botto et al., 2006)

2.3.2.2 Pulmonalarterielle glatte Muskelzellen

Das Ausmaß der chronisch hypoxischen pulmonalen Hypertonie wird durch die strukturellen Veränderungen in der Media, als Bestandteil der Pulmonalarterie, mit bestimmt. Diese Veränderungen beinhalten die Proliferation und Hypertrophie der glatten Muskelzellen, die vermehrte Produktion von Matrixproteinen und die Rekrutierung von adventitiellen oder zirkulierenden Zellen. Vielfältige Mediatoren mit folgenden Signaltransduktionen beeinflussen die Reaktion der glatten Muskelzellen auf Hypoxie. So haben beispielsweise verschiedene Studien Serotonin mit seinem Rezeptor (5-HT-Rezeptor) als einen wichtigen Mediator unter Hypoxie in der Media identifiziert (MacLean et al., 2004; Long et al., 2006). Serotonin ist über den 5-HT Rezeptor in den glatten Muskelzellen an deren Kontraktilität und Wachstum beteiligt. Neben diesen Reaktionen nimmt Hypoxie auch direkten Einfluss auf die Kontraktilität der glatten Muskelzellen und damit auf den Tonus der Pulmonalarterien. Verschiedene Kaliumkanäle in der Plasmamembran tragen wesentlich zur Funktionsfähigkeit der glatten Muskelzelle bei. So kommt es unter Hypoxie beispielsweise zu einer Reduktion des spannungsgesteuerten Kaliumkanals (K_V) mit gleichzeitig erhöhtem intrazellulären Kalzium ($[Ca^{2+}]_i$). Dieser Vorgang hat die Depolarisation der Membran zur Konsequenz (Semenza, 2004). Die glatten Muskelzellen sind somit ein entscheidender funktioneller Bestandteil des vaskulären Remodellings unter Hypoxie.

2.3.2.3 Pulmonalarterielle Fibroblasten

Die Adventitia von Gefäßen hat grundsätzlich eine wichtige Aufgabe in der Speicherung, Integration, Rückgewinnung und Sekretion von Regulatoren für die normale Funktion des Gefäßes. Unter bestimmten Voraussetzungen spielt dieser Teil der Gefäßwand allerdings eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von pathologischen Veränderungen (Stenmark et al., 2006). In allen bislang untersuchten Spezies führte Hypoxie zu dramatischen Veränderungen in der Adventitia (Stenmark et al., 2006). Immer mehr experimentelle Untersuchungen belegen, dass die pulmonalarteriellen Fibroblasten (PA-FB) die ersten Zellen sind, die auf vaskulären Stress, wie Hypoxie oder Überdehnung, reagieren. Die Stressantwort bezieht sich dabei primär auf die Proliferation, die vermehrte Produktion von extrazellulären Matrixproteinen und auf die gesteigerte Sekretion von Wachstumshormonen, welche direkt die glatten Muskelzellen der Media bezüglich Proliferation und Tonus beeinflussen (Meyrick and Reid, 1979; Sartore et al., 2001). Jede dieser Hypoxie-induzierten Veränderungen im Phänotyp der

pulmonalarteriellen Fibroblasten moduliert damit entweder direkt oder indirekt die gesamte vaskuläre Funktion und Struktur.

In vitro Experimente haben gezeigt, dass unter Hypoxie die PA-FB stärker proliferieren als die glatten Muskelzellen (Das et al., 2001; Welsh et al., 2001). Die Proliferation von Fibroblasten unter hypoxischen Bedingungen scheint auf die Pulmonalarterie beschränkt zu sein (Welsh et al., 2001). Der genaue Mechanismus ist noch nicht eindeutig geklärt und wird im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Neben der Proliferation von PA-FB und der Interaktion mit anderen Zelltypen der Gefäßwand über die Sekretion von Proteinen gibt es Hinweise, dass auch die Migration in andere Gefäßwandschichten und die Transdifferenzierung in Myofibroblasten wichtige Reaktionen der Fibroblasten im vaskulären Remodelling sind (Short et al., 2004; Sobin et al., 1983).

2.4 Die Hypoxie-induzierbaren Faktoren

2.4.1 Einleitung

Der erste identifizierte Transkriptionsfaktor, der spezifisch durch Hypoxie aktiviert wurde war der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 (HIF-1). Er wurde über die genauere Untersuchung der molekularbiologischen Mechanismen der Erythropoetin (EPO) Induktion, und damit der Induktion der Erythropoese, mit folgender Erhöhung der Sauerstoffbindungskapazität des Blutes, entdeckt (Goldberg et al., 1988; Semenza et al., 1991). In weiterführenden Studien zeigte sich, dass HIF-1 direkt eine Vielzahl von Zielgenen über ein Hypoxie-responsives DNA Bindungselement (HRE) aktiviert (Wenger et al., 2005; Wang et al., 1995). Die so aktivierten Zielgene steuern dann die Anpassungsvorgänge der Zellen unter Hypoxie. Die HIF gesteuerten zellulären Anpassungsvorgänge bezüglich des vaskulären Remodelling unter Hypoxie betreffen vor allem die Proliferation, Migration, Transdifferenzierung, den extrazellulären Matrix-Stoffwechsel, die pH Einstellung und die Regulation von Enzymen, Liganden, Rezeptoren und Ionenkanäle, die sowohl die Vasokonstriktion, wie auch die Vasodilatation beeinflussen.

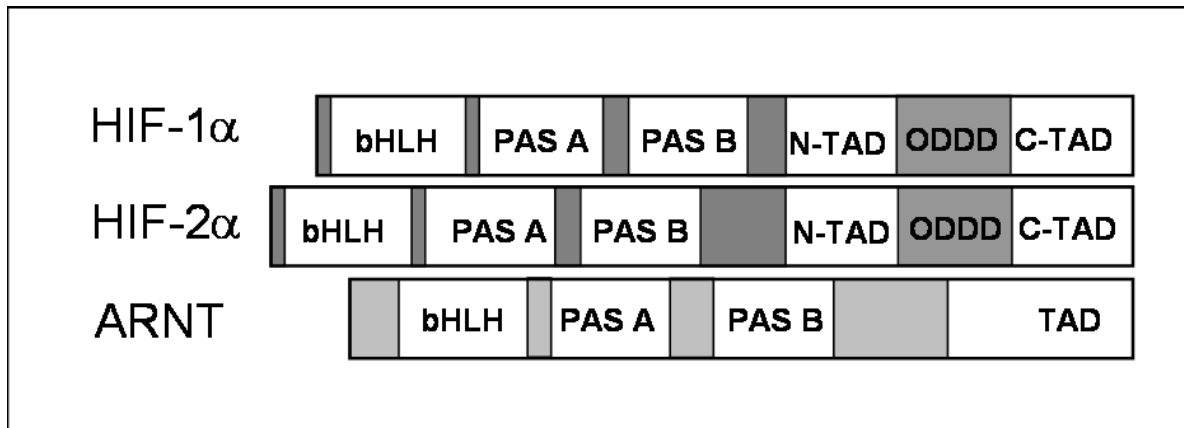


Abbildung 1: Schematische Darstellung von HIF-1α, HIF-2α und ARNT

HIF-1α, HIF-2α und ARNT sind basic-Helix-Loop-Helix-Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS) Proteine, die N-terminal eine bHLH Domäne und zwei PAS Domänen enthalten. HIF-1α und HIF-2α beinhalten zusätzlich eine „oxygen-dependent degradation domain“ (ODDD), welche die Sauerstoff regulierte Stabilität vermittelt. Weiterhin N- und C-terminal die Transaktivierungsdomäne (N-TAD und C-TAD). Die C-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD) von ARNT spielt in dem Zusammenhang der HIF-α Aktivität keine Rolle. (modifiziert nach Fedele et al., 2002)

2.4.2 Die Struktur von HIF

Der HIF-1 Komplex ist ein Heterodimer, der aus zwei strukturell ähnlichen Untereinheiten besteht: HIF-1α und HIF-1β. Das HIF-1β wird auch als ARNT „aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ bezeichnet und wurde initial als Heterodimer Partner von dem Aryl Hydrokarbon Rezeptor (AHR) identifiziert. Es ist der ubiquitär exprimierte Bindungspartner der Hypoxie regulierten Alpha-Untereinheit des HIF Transkriptionskomplexes. Von der regulativen α-Untereinheit sind mittlerweile drei Isoformen bekannt: HIF-1α, HIF-2α und HIF-3α. Das bislang wenig untersuchte HIF-3α wird eher mit inhibitorischen Funktionen in Verbindung gebracht (Makino et al., 2001), während HIF-1α und HIF-2α die beiden funktionell relevanten Isoformen sind. Die zweite Isoform (HIF-2α) wurde kurz nach HIF-1α entdeckt und ist dem HIF-1α in seiner Struktur sehr ähnlich, wie in Abbildung 1 dargestellt. Die Expression von HIF-2α wurde hauptsächlich in der Lunge, im Endothel und im Sinus caroticus gefunden, während HIF-1α ubiquitär exprimiert wird. Beide Isoformen gehören zur Familie der „basic-Helix-Loop-Helix (bHLH)-Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS)“ Proteine (Wang et al., 1995; Tian et al., 1997; Giatromanolaki et al., 2006; Ema et al., 1997). Sie bilden ein

DNA bindendes Heterodimer mit HIF-1 β . Die Dimerisierung der Alpha- und Beta-Untereinheit erfolgt an der N-terminalen bHLH Domäne, die mit den zwei PAS Domänen (PAS-A und PAS-B) auch wesentlich für die DNA Bindung zuständig ist. Die C-terminale Domäne ist die regulative Domäne. Hier finden sich die Transaktivierungsdomänen (N-TAD und C-TAD), sowie die „oxygen-dependent degradation domain“ (ODDD), also die sauerstoffabhängige Degradierungsdomäne.

2.4.3 Regulation der Hypoxie induzierbaren Faktoren

2.4.3.1 Stabilisierung von HIF-1 α und HIF-2 α

Während HIF-1 β ubiquitär und damit Sauerstoff unabhängig exprimiert wird, sind HIF-1 α und HIF-2 α erst unter hypoxischen Bedingungen aktiv. Diese Aktivierung und Stabilisierung findet auf Proteinebene statt, während die zugehörige mRNA im Wesentlichen nicht reguliert wird (Wang et al., 1995; Kallio et al., 1997; Wiesener et al., 1998). In Normoxie ist HIF-1 α wegen des schnellen Abbaus durch das Proteasom nicht detektierbar (Salceda and Caro, 1997; Huang et al., 1998; Kallio et al., 1999). Die Halbwertszeit in Normoxie beträgt hierbei circa 10 Minuten und wird unter Sauerstoff Entzug auf circa 30 Minuten erhöht (Huang et al., 1998). Die Stabilität von HIF- α wird gesteuert über Veränderungen in der ODD-Domäne, die folgend eine Bindung des von Hippel-Lindau Tumor Suppressor (pVHL) Proteins ermöglichen. Der pVHL arbeitet als Bestandteil der multimerischen E3 Ubiquitin Ligase, welche über das Proteasom Proteine abbaut. In Normoxie bindet pVHL und ermöglicht so den Abbau des Proteins am Proteasom. Entscheidend für diese Bindung ist eine Hydroxylierung von Proline Aminosäuren in der ODD-Domäne (Maxwell et al., 1999).

2.4.3.2 Sauerstoffabhängige Prolin Hydroxylierung

Die Hydroxylierung von Prolin Aminosäuren in der ODD-Domäne ist verantwortlich für die Verbindung von HIF-1 α oder HIF-2 α mit pVHL. Die Hydroxylierung des Prolins wird vermittelt über HIF- α Prolyl-4-Hydroxylasen den so genannten „prolyl hydroxylase domain-containing“ (PHD). Diese PHD sind abhängig von Fe²⁺, 2-Oxoglutarat und Sauerstoff und bewirken die Proline Hydroxylierung an Position 402 und 564, mit folgender pVHL Bindung und dem Abbau des Proteins am Proteasom. In Hypoxie hingegen wird das Prolin nicht hydroxyliert und somit kann pVHL nicht binden und HIF nicht am Proteasom abgebaut werden.

2.4.3.3 Transkriptionelle Aktivierung durch HIF-1 α und HIF-2 α

HIF- α enthält zwei Transaktivierungsdomänen. Die erste Transaktivierungsdomäne befindet sich N-terminal innerhalb der ODD-Domäne. Die dominierende Transaktivierungsdomäne befindet sich C-terminal und besteht aus 40 Aminosäuren. Diese C-terminale Transaktivierungsdomäne (C-TAD) bildet den zweiten Schritt in der Regulation von HIF- α . In Normoxie wird die C-TAD über eine Asparagine Hydroxylase hydroxyliert, was die Bindung von Ko-Aktivatoren (CBP/p300) inhibiert (Mahon et al., 2001). Diese Ko-Aktivatoren sind zur vollständigen Funktion des Transkriptionskomplexes notwendig. Somit kann die Transkription in Normoxie nicht stattfinden. Die für diesen Vorgang verantwortliche Asparagine Hydroxylase wird auch „factor inhibiting HIF-1“ (FIH-1) genannt und ist wiederum abhängig von der Anwesenheit von Sauerstoff, 2-Oxoglutarat und Fe²⁺ (Mahon et al., 2001). In Hypoxie findet die Hydroxylierung nicht statt, was die Bindung der Ko-Aktivatoren ermöglicht und somit eine Transkription der jeweiligen Zielgene. In der Abbildung 2 sind die Regulationsmechnismen anhand von HIF-1 α in einer Übersicht schematisch skizziert.

2.4.3.4 Andere Regulationsmechanismen

Die Hydroxylasen in der HIF- α Regulation sind nicht die einzigen Mechanismen, die die transkriptionelle Aktivität oder Stabilität von HIF- α beeinflussen. Wie im unteren Teil der Abbildung 2 dargestellt, spielen die Signaltransduktionswege über die Phosphatidylinositol-3`Kinasen (PI3K), wie auch über die Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK) eine wichtige Rolle. Am Anfang der Signaltransduktion stehen die Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTK), die über bestimmte Liganden aktiviert werden. Dies führt folgend zur Aktivierung der PI3K , die über die Proteinkinase B (AKT) die HIF-1 α Expression steigert. (Laughner et al., 2001). In dem MAP Kinasen Signaltransduktionsweg kommt es auch über Liganden zur Aktivierung der RTK, die dann über p42 und p44 („extracellular signal-regulated kinase“ ERK) zu einer Phosphorylierung von HIF-1 α . Diese Phosphorylierung führt dann zur Steigerung der transkriptionellen Aktivität (Richard et al., 1999). Diese exemplarisch aufgeführten Interaktionen mit der HIF-Expression und Aktivität sind die zurzeit am besten charakterisierten Signaltransduktionen.

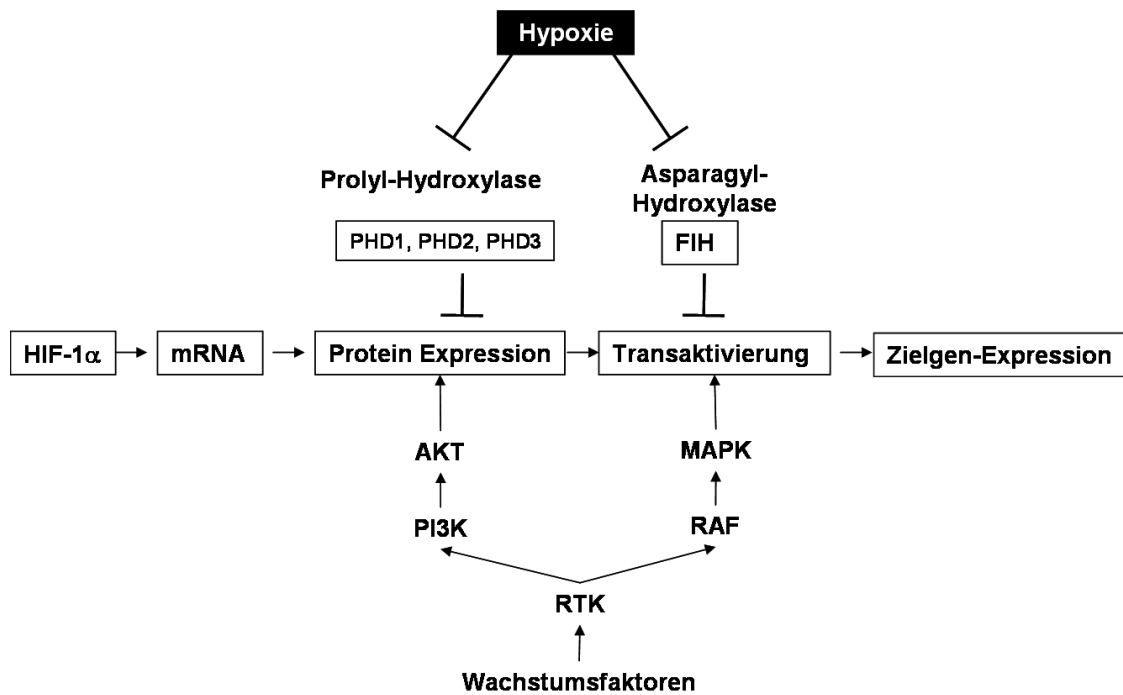


Abbildung 2: Die Regulation von HIF-1 α

Von der HIF-1 α DNA entsteht die zugehörige messenger RNA mit folgender Proteinexpression. In Hypoxie kommt es zu einer Transaktivierung und damit zur Zielgenexpression. Die Proteinexpression bzw. die Proteinstabilität und die Transaktivierung wird über Hydroxylasen (oben) und zum anderen über Wachstumsfaktoren (unten) mit beeinflusst. Unter Hypoxie sind die verschiedenen Prolyl Hydroxylasen (PHD1, PHD2, PHD3) inaktiv, so dass der von Hippel Lindau Tumor Suppressor nicht binden kann und HIF-1 α somit nicht am Proteasom abgebaut werden kann. Weiterhin fehlt unter Hypoxie das Substrat für die Asparagyl-Hydroxylase (FIH, „factor inhibiting HIF-1“) womit die Transaktivierungsdomäne nicht länger inhibiert wird. Neben diesen Regulationsmechanismen ist auch der Phosphatidylinositol-3`Kinase (PI3K) Signaltransduktionsweg und der Mitogen aktivierte Protein Kinase (MAPK) Weg entscheidend an der Regulation von HIF beteiligt. Beide Signaltransduktionen werden über Rezeptortyrosinkinasen (RTK) aktiviert. Der PI3K Signaltransduktionsweg führt über Proteinkinase B (AKT) zu einer vermehrten HIF-1 α Expression, während es bei den Mitogen aktivierte Protein Kinasen zu einer verstärkten transkriptionellen Aktivität von HIF-1 α kommt (modifiziert nach Semenza, 2002).

2.4.4 Transkription Hypoxie induzierbarer Gene durch HIF

Unter hypoxischen Bedingungen werden HIF-1 α und HIF-2 α vom Zytoplasma in den Zellkern transloziert, wo sie mit dem konstitutiv nukleären HIF-1 β (ARNT) heterodimerisieren wie in der Abbildung 3 schematisch skizziert dargestellt (Kallio et al., 1998). Der HIF Komplex bindet gemeinsam mit Ko-Aktivatoren (z.B. CBP/p300) an der HRE DNA Sequenz des jeweiligen Zielgens und induziert dadurch dessen Transkription. Alle HIF-1 α induzierbaren Gene beinhalten mindestens eine Kopie der HRE Konsensussequenz 5`RCGTG 3` (Guillemin and Krasnow, 1997; Wenger et al., 2005). Wie HIF-1 α kann auch HIF-2 α über die HRE Konsensus-Sequenz die jeweiligen Zielgene aktivieren. Über die gemeinsamen Zielgene hinaus sind für beide Isoformen spezifische Zielgene bekannt, die nicht von der anderen Isoform aktiviert werden. So konnte beispielsweise für den „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) Rezeptor 2 eine spezifische HIF-2 α Abhängigkeit gezeigt werden (Tian et al., 1997; Ema et al., 1997; Elvert et al., 2003). Der genaue Mechanismus der Isoform spezifischen Zielgenaktivierung ist bislang noch nicht eindeutig geklärt.

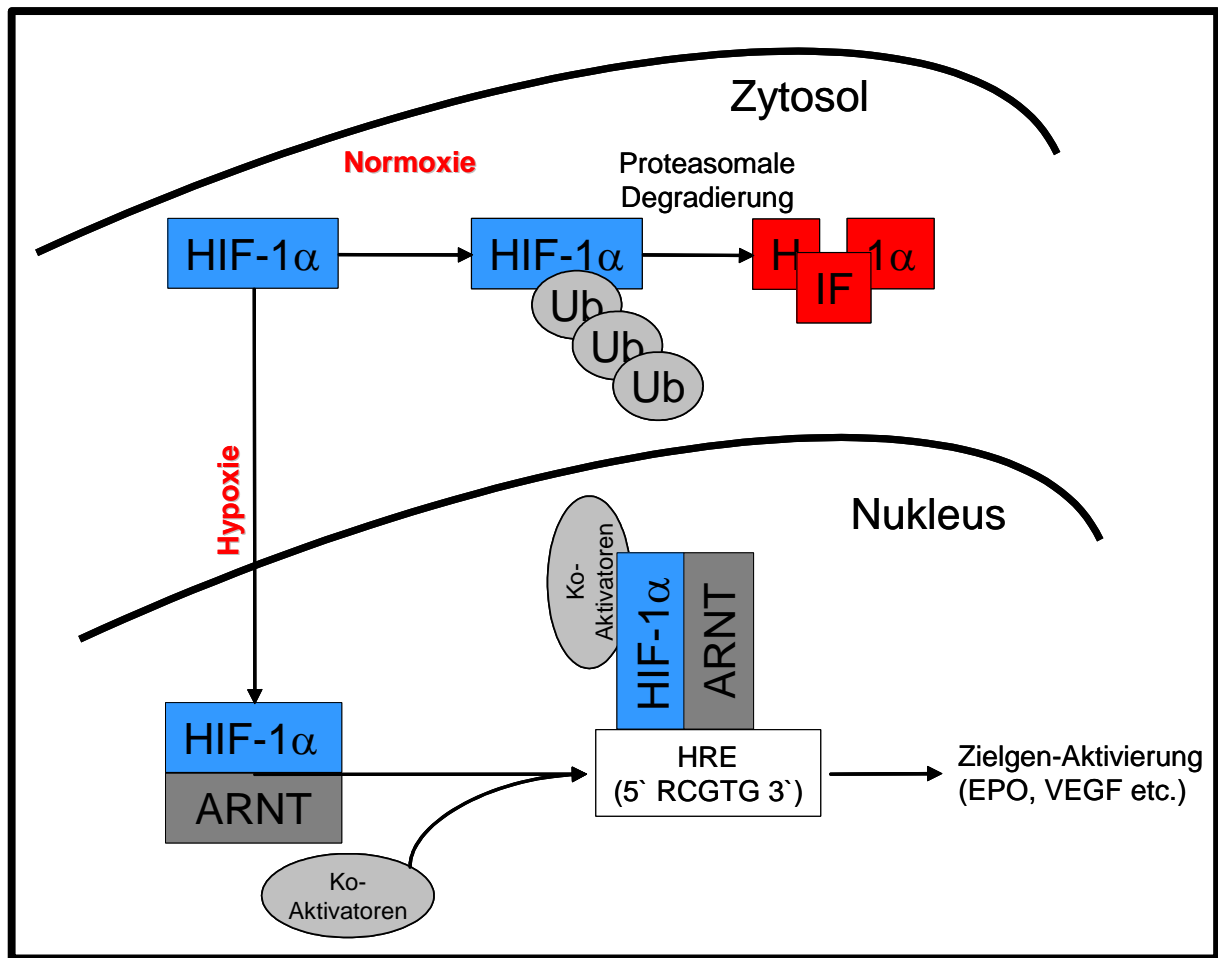


Abbildung 3: Hypoxie induzierte Genregulation durch HIF-1α

In Normoxie ist HIF-α transkriptionell inaktiv und wird direkt durch den Ubiquitin (Ub) Proteasom Weg abgebaut. In Hypoxie hingegen wird HIF-α auf Protein Ebene stabilisiert und vom Zytosol in den Zellkern transloziert, wo die Dimerisierung mit HIF-1β folgt. Dieser Komplex bindet mit Ko-Aktivatoren (CBP/p300) an die HRE assoziierten Gene, um deren Transkription zu initiieren. (modifiziert nach Fedele et al., 2002).

2.4.5 Die Hypoxie-induzierbaren Faktoren im vaskulären Remodelling

Die HIF gesteuerten zellulären Anpassungsvorgänge im vaskulären Remodelling unter Hypoxie betreffen vor allem die Proliferation, Migration, Transdifferenzierung, den extrazellulären Matrix-Stoffwechsel, die pH Einstellung und die Regulation von Enzymen, Liganden, Rezeptoren und Ionenkanäle. Diese Anpassungsvorgänge können sowohl die Vasokonstriktion, wie auch die Vasodilatation beeinflussen.

Die ersten Analysen über die Funktion von HIF-1 α im vaskulären Remodelling wurden an HIF-1 α knock out Mäusen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die homozygoten Mausembryos im Gestationsalter von E9 in der Entwicklung stehen blieben. Sie starben im Alter von E10.5 an kardialen Fehlbildungen, vaskulärer Regression und durch einen ausgedehnten Zelltod (Iyer et al., 1998). Aus diesem Grund wurden die heterozygoten Mäuse (HIF-1 α +/-), die sich normal entwickelten und vom Wildtyp nicht zu unterscheiden waren, im Modell der pulmonalen Hypertonie, induziert durch chronische Hypoxie (10% O₂ für drei Wochen), verwendet. In diesen Versuchen entwickelte der Wildtyp eine massive rechtsventrikuläre Hypertrophie als Resultat eines stark erhöhten rechtsventrikulären Druckes. Der erhöhte Druck konnte auf die Hypoxie-induzierten Umbauprozesse der kleinen pulmonalarteriellen Arteriolen zurückgeführt werden. Morphologisch zeigten die Arteriolen einen höheren Muskularisierungsgrad mit einer Vergrößerung der Media-Wanddicke. Die HIF-1 α +/- Mäusen hingegen zeigten die Veränderungen der rechtsventrikuläre Hypertrophie und des rechtsventrikulären Druckes in einem wesentlich geringerem Ausmaß, was auf die fehlenden Veränderungen der pulmonalarteriellen Arteriolen zurück geführt wurde (Yu et al., 1999).

Wie bereits erwähnt ist HIF-2 α dem HIF-1 α sehr ähnlich und auch in der Lage mit HIF-1 β zu dimerisieren und damit die jeweiligen Zielgene zu aktivieren. Während HIF-1 α ubiquitär exprimiert wird konnte HIF-2 α nur in bestimmten Gewebearten gefunden werden. Die größte Expression konnte dabei im Gefäßsystem und in der Lunge gefunden werden. In Studien an heterozygoten HIF-2 α Knock-out Mäusen (HIF-2 α +/-) konnte gezeigt werden, dass diese Mäuse vor Hypoxie induzierter pulmonaler Hypertonie geschützt waren (Brusselmans et al., 2003). Für diesen Effekt wurde vor allem der fehlende Anstieg von Endothelin-1 und der Plasma-Katecholamine verantwortlich gemacht (Brusselmans et al., 2003). In diesen beiden heterozygoten Knock-out Modellen (HIF-1 α +/- und HIF-2 α +/-) wurde weiterhin auf zellulärer Basis die Veränderungen glatter Muskelzellen (PA-SMC, „pulmonary artery smooth muscle cells“) und Endothelzellen (PA-EC) untersucht. In den PA-SMC des Wildtyps

wurde unter Hypoxie eine Depolarisation der Zellmembran gefunden, was an der Reduktion von spannungsabhängigen Kaliumkanälen (Kv) lag. Dieser Hypoxie-Effekt wurde in den HIF-1 α +/- PA-SMC aufgehoben (Shimoda et al., 2001). Weiterhin wurde eine starke HIF-1 α Expression in den plexiformen Läsionen der Intima gefunden, die für einen autokrinen und parakrinen Mechanismus aus vermehrter Sezernierung von Endothelin-1 (ET-1) und „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) mit gleichzeitig vermehrter Expression des mitogenen VEGF Rezeptors 2 verantwortlich ist (Tuder et al., 2001). Wie in Abbildung 4 schematisch skizziert, sind die Hypoxie-induzierbaren Faktoren in den Endothel- und glatten Muskelzellen an dem vaskulären Remodelling unter Hypoxie beteiligt. Die Rolle der Hypoxie induzierten Faktoren in den Fibroblasten der Adventitia ist hingegen noch nicht eindeutig erklärt und wird im Rahmen dieser Arbeit näher analysiert.

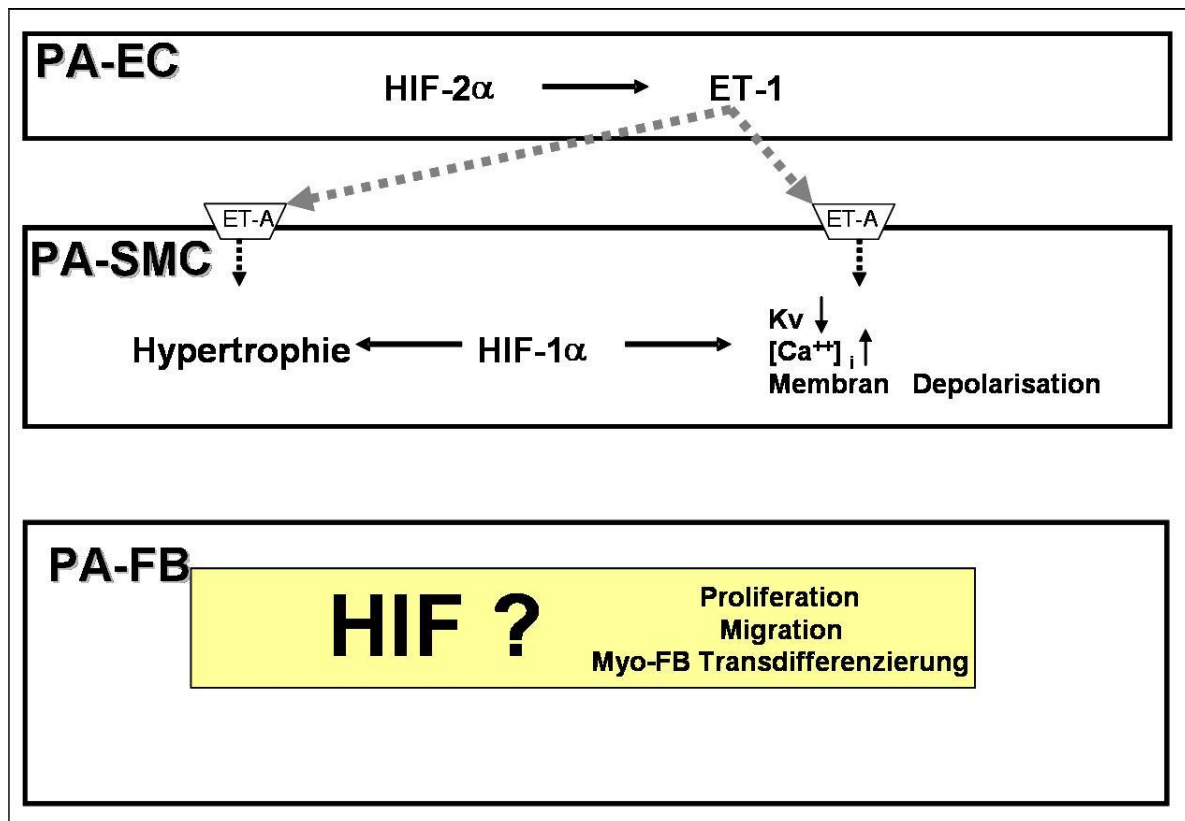


Abbildung 4: HIF in der physiologischen Antwort der pulmonalen Arteriolen unter chronischer Hypoxie

In pulmonalarteriellen Endothelzellen (PA-EC) wird unter hypoxischen Bedingungen über die Aktivierung von HIF-2 α die Produktion und Sekretion von Endothelin-1 (ET-1) gesteigert. Nach der Sekretion bindet ET-1 an die Rezeptoren (ET-A) der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PA-SMC) und stimuliert somit die Hypertrophie und die Depolarisation der Membran. In den PA-SMC stimuliert Hypoxie auch direkt HIF-1 α abhängig die Membran-Depolarisation und die Hypertrophie. Unklar bleibt die Rolle von HIF in den pulmonalarteriellen Fibroblasten. Kv = spannungsabhängige Kaliumkanäle; [Ca⁺⁺]_i = intrazelluläre Ca⁺⁺ Konzentration. (modifiziert nach Semenza, 2002).

2.5 RNA Interferenz

Die vollständige Sequenzierung des humanen Genoms zeigt die Relevanz neu entdeckte Gene funktionell analysieren zu können, damit die Pathophysiologie von Krankheiten verstanden wird und damit neue Therapiekonzepte entwickelt werden können. Dafür ist eine schnelle Umsetzung von der genomischen Information über die funktionelle Analyse zu neuen Therapien notwendig. Die Technik der Gen-Inhibition mittels RNA-Interferenz (RNAi) könnte dafür ein geeignetes Werkzeug sein. Sie ermöglicht der biomedizinischen Forschung krankheitsbezogene Gene als therapeutische Ziele spezifisch und schnell zu validieren. Entdeckt wurde dieses Prinzip 1998 als Andrew Fire und Craig Mello doppelsträngiger RNA in *Caenorhabditis elegans* injizierten und damit einen sequenzspezifischen Abbau der zytoplasmatischen mRNA auslösten (Fire et al., 1998).

Das physiologische Prinzip der Gen-Inhibition mittels RNAi beruht auf der Bildung von doppelsträngiger RNA (dsRNA). Wenn Viren eukaryotische Zellen infizieren, oder wenn Transposons zufällig in die Wirts-DNA integriert werden, dann bilden diese fremden Gene große Mengen dsRNA. Die meisten Eukaryoten, inklusive der Menschen, besitzen ein angeborenes Immunsystem, dass spezifisch auf die Anwesenheit von dsRNA reagiert. Es kommt zu einer Aktivierung von Prozessen, die post-transkriptionell die fremden Gene inhibieren (Hammond et al., 2001; Hutvagner and Zamore, 2002; Sharp, 2001; Waterhouse et al., 2001). Dieser Mechanismus wird RNA Interferenz (RNAi) genannt. In dem Prozess der Interferenz werden die langen dsRNA Abschnitte in viele „*small interfering RNAs*“ (siRNAs) gespalten, welche damit homologe RNA Kopien von bestimmter Länge und Struktur repräsentieren. Die siRNAs leiten die Degradation der homologen Ausgangs-mRNA durch spezifische Bindung ein (Elbashir et al., 2001). Die Transfektion von synthetisch hergestellten siRNAs erreicht in der Zellkultur eine potente und lang anhaltende post-transkriptionelle Inhibition des spezifischen Gens (Elbashir et al., 2001). Die Applikation der kleineren (21-23 Nukleotide) siRNA ist im Vergleich zu der wesentlich größeren dsRNA von Vorteil, da die Zellen eine angeborene zusätzliche Immunantwort besitzen, welche durch dsRNA Komplexe größer als 30 Basenpaare ausgelöst wird. Der Inhibitionseffekt der siRNA hält zum einen über Tage an, und ist zum anderen hoch spezifisch. Schon der Austausch von nur einem Basenpaar hat den Verlust der Inhibition zur Folge. Durch die Potenz, die Spezifität und die Dauer der Inhibition, sowie die schnelle und unproblematische Herstellung hat die siRNA Technik zu einer vielversprechenden Option zur Gen-spezifischen Therapie von Krankheiten wie bösartigen Tumoren, viralen Infektionen und Gendefekten werden lassen.

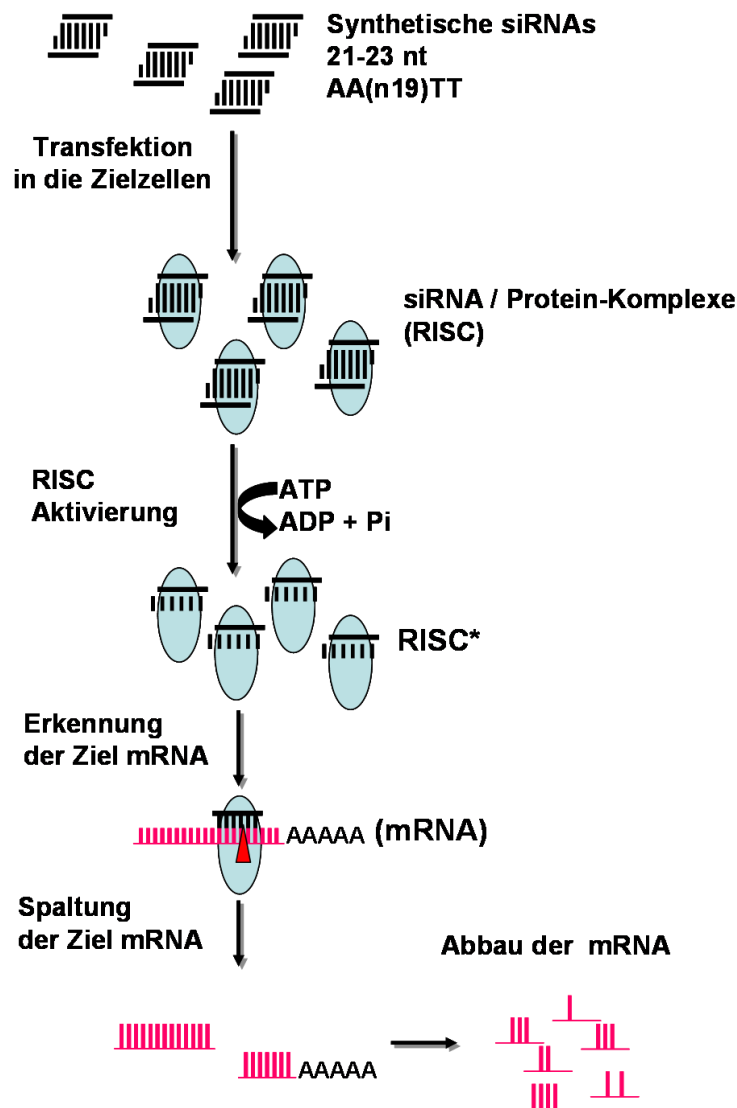


Abbildung 5: Prinzip der siRNA Funktionsweise

Die synthetisch hergestellte (AA(n19)TT) small interfering RNA (siRNA) wird in die Zielzellen transfiziert. In den Zellen bildet die siRNA mit zelleigenen Proteinen einen Komplex, den RNA induced silencing Complex (RISC). Nach der Entwindung der siRNA wird ein Strang unter Energieverbrauch (ATP, Adenosintriphosphat, ADP, Adenosindiphosphat) abgespalten und der RISC somit aktiviert (RISC*, aktivierter RISC). Folgend findet die Erkennung und Bindung der Ziel RNA statt. Die im RISC* befindlichen Endonukleasen spalten die mRNA, welche dann sofort degradiert wird. (modifiziert nach Tuschl et al 2004).

Die siRNA wird nach dem von Elbashir et al., 2001 beschriebenen Muster synthetisch hergestellt und in die Zielzellen transfiziert. Die siRNA wird danach, wie in der Abbildung 5 schematisch skizziert, in einen Komplex aus verschiedenen intrazellulären Proteinen integriert. Dieser Protein-Komplex beinhaltet Nukleasen und wird als RNA-induced-silencing-complex (RISC) bezeichnet. Im Anschluss an die Inkorporation in den RISC wird die siRNA in einer ATP-abhängigen Reaktion entwunden und einer der beiden Stränge bleibt als so genannte *guide*-RNA mit dem RISC assoziiert. Der verbleibende Komplex wird auch als aktivierter RISC oder RISC* bezeichnet. Die Erkennung der Ziel-mRNA durch den RISC* erfolgt über die Hybridisierung mit der *Ziel*-mRNA. Nach der Erkennung wird die mRNA an einer spezifischen Position innerhalb des Hybrides durch Endonukleasen hydrolysiert. Während die dabei entstehenden mRNA-Fragmente durch unspezifische Nukleasen im Zytosol abgebaut werden, bleibt der im RISC befindliche RNA-Strang unbeeinträchtigt. Der bereits aktivierte RISC kann somit weitere mRNA-Degradationszyklen durchlaufen (Meister and Tuschl, 2004).

Zusammenfassend unterscheidet die Sequenz-Spezifität von siRNA zwischen Ziel mRNAs, die nur in einer Base abweichen (Elbashir et al., 2001; Brummelkamp et al., 2002). Somit stellt diese Form der Geninhibition möglicherweise einen neuen Weg in der Gentherapie dar. Die Expression von mRNA, kodierend für mutierte Proteine in genetischen Erkrankungen oder in vielen Neoplasien, könnte über den Einsatz spezifischer siRNA komplett blockiert werden. Dieses therapeutische Potential von siRNA Anwendungen konnte in mehreren Tiermodellen bereits nachgewiesen werden, so schütze siRNA Mäuse beispielsweise vor fulminanter Hepatitis, viralen Infektionen, Sepsis und Tumorwachstum (Song et al., 2003).

2.6 Fragestellung

Die pathologischen Veränderungen der pulmonalen Hypertonie basieren hauptsächlich auf pulmonalvaskulären Remodellingprozessen ausgelöst durch Vasokonstriktion. Die pulmonalarteriellen Fibroblasten (PA-FB) spielen in der strukturellen Änderung der Gefäßwand eine entscheidende Rolle. Der zentrale Stimulus für die Umbauprozesse PA-FB ist die Hypoxie. Sie führt zu Änderungen der Proliferation, Migration und Transdifferenzierung der adventitiellen Zellen. Die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) sind entscheidende Transkriptionsfaktoren in der Antwort auf Hypoxie. Sie steuern über die Aktivierung ihrer Zielgene die zelluläre Reaktion. Ausgangspunkt der Arbeit war die Beobachtung, dass PA-FB im Vergleich zu den glatten Muskelzellen der Pulmonalarterie (PA-SMC) unter Hypoxie vermehrt proliferieren und damit einen entscheidenden Einfluss auf das vaskuläre Remodelling haben. Es ist unklar, welche Funktion die unterschiedlichen HIF Isoformen (HIF-1 α und HIF-2 α) in diesen Prozessen haben.

Ziel dieser Arbeit war es die Rolle der Hypoxie induzierbaren Faktoren in pulmonalarteriellen Fibroblasten unter Hypoxie zu untersuchen. Als Hypothese wurde postuliert, dass die zwei HIF Isoformen, HIF-1 α und HIF-2 α , unterschiedlichen Einfluss auf die hypoxische Reaktion pulmonalarterieller Fibroblasten haben. Dazu wurde im ersten Schritt die Technik der Geninhibition mittels siRNA an einer Modellzelllinie etabliert. Die hieraus gewonnenen Daten bezüglich der Zeitkinetik und der zu verwendenden Konzentration wurde auf die Inhibition von HIF-1 α in dieser Zelllinie übertragen. Im Anschluss an diese Vorarbeiten wurden die primär isolierten, humanen Fibroblasten der Pulmonalarterie bezüglich der zellphysiologischen Reaktion (Proliferation, Migration, Apoptose und Transdifferenzierung) auf den Stimulus Hypoxie untersucht. Im folgenden Schritt wurde die Expression von HIF-1 α und HIF-2 α in den PA-FB in Normoxie und Hypoxie dargestellt und die Potenz der Inhibition mit siRNA in den primären Zellen ermittelt. Im letzten Teil wurden die Auswirkungen der HIF Inhibition auf die zellphysiologische Reaktion der PA-FB unter Hypoxie untersucht. Wie in Abbildung 6 schematisch dargestellt gliedert sich die vorliegende Arbeit in drei Abschnitte, die Etablierung der siRNA Technik an A549 Zellen, die Inhibition von HIF-1 α an A549 Zellen und abschließend die Untersuchung zur Rolle der Hypoxie-induzierbaren Faktoren in pulmonalarteriellen Fibroblasten.

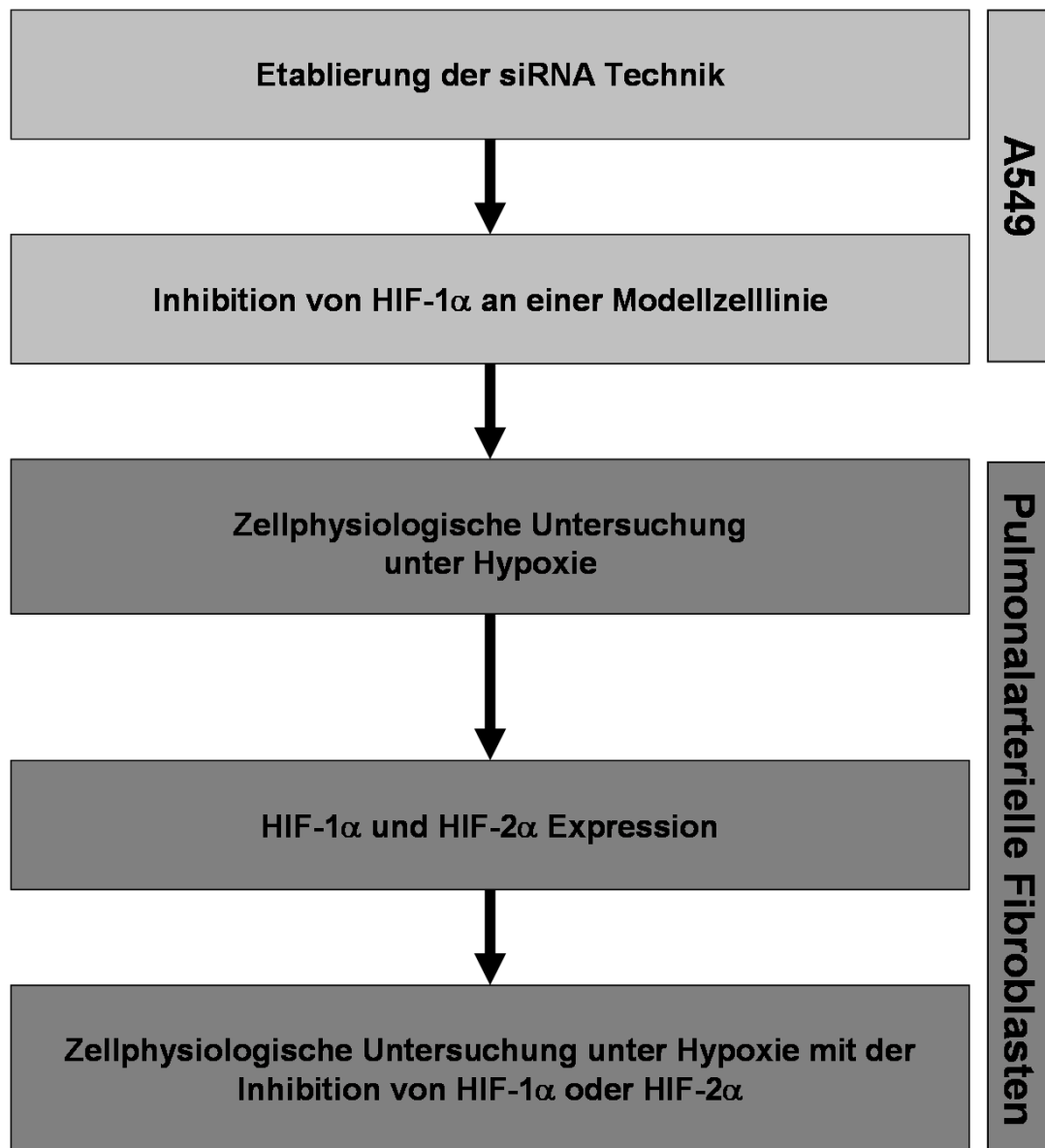


Abbildung 6: Übersicht der durchgeführten Untersuchungen

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zellkultur der A549 Zellen

Für die vorliegende Arbeit wurde die humane Adenokarzinomzelle A549 als Modellzelllinie verwendet. Diese Tumorzelllinie ist bei der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) verzeichnet (A549- Zellen: CCL- 185). Zur Kultivierung wurden 430 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-F12-Medium (Gibco Invitrogen, Paisley, United Kingdom) mit 5 ml Penicillin- Streptomycin (PAN- Biotech GmbH, Aidenbach), 5 ml nichtessentiellen Aminosäuren (Gibco Invitrogen, Paisley, United Kingdom), 5 ml MEM-Vitaminen (Gibco Invitrogen, Paisley, United Kingdom), 5 ml Glutamin (PAN- Biotech GmbH, Aidenbach) und 50 ml fetalem Kälberserum (Foetal Bovine Serum, PAA, Pasching, Österreich) angereichert. Die Zellen wurden auf 75 mm² Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) ausgesät, dreimal wöchentlich wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Bei Konfluenz wurden die Zellen mit DMEM- F12 gewaschen, mit 5 ml Trypsin (Trypsin-EDTA 100 fach konzentriert, PAN- Biotech GmbH, Aidenbach, mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf 1 fache Konzentration verdünnt) abgelöst, und in 50 ml Zentrifugationsröhrchen (PP-Testtubes, Greiner Bio- One, Frickenhausen), in die 1 ml FKS vorgelegt wurde, überführt. Dann wurde mit DMEM- F12 gewaschen, zentrifugiert und die Zellen im Verhältnis 1:10 verdünnt neu ausgesät.

3.1.2 Transfektion der A549 Zellen

Die A549-Zellen wurden mittels Lipofectamine™2000 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) transfiziert. Bei dieser Methode bildet die DNA bzw. RNA mit dem Reagenz Liposome, welche dann von den Zellen durch Endozytose aufgenommen werden. Zur Vorbereitung wurden die Zellen 24 Stunden vor der Transfektion unter Verwendung des üblichen Kulturmediums auf Platten ausgesät. Direkt vor der Transfektion wurden die Zellen zweimal gewaschen. Ein Mix aus OptiMEM (Gibco Invitrogen, Paisley, United Kingdom) und Kulturmedium (ohne Antibiotika und FKS) im Verhältnis 1:1 wurde auf die Zellen gegeben. Zur Transfektion wurden die DNA bzw. RNA als auch das Lipofectamine™2000 getrennt mit OptiMEM verdünnt. Nach fünf Minuten wurden die entsprechenden Mengen des verdünnten Lipofectamine™2000 zu den einzelnen DNA / RNA Verdünnungen gegeben. Es erfolgte eine 25 Minuten andauernde Inkubation auf dem Schüttler zur Bildung von DNA-Lipofectamine™ 2000 - bzw. RNA- Lipofectamine™ 2000- Komplexen. Danach wurden die Mixturen zu den Zellen gegeben. Nach sechs bis acht stündiger Inkubationszeit wurden die

Zellen zweimal gewaschen und das Transfektionsgemisch durch Kulturmedium ersetzt (mit variierten FKS Konzentrationen, je nach durchgeführter Versuchsreihe). Die Konzentration der siRNA in den Versuchen war 40nM, während die DNA, das Lipofectamine™ 2000, sowie die einzelnen Verdünnungen nach den Mengenangaben im Lipofectamine™ 2000 Standardprotokoll an die jeweiligen Oberflächen der benutzten Kulturgefäße angepasst wurde (Tabelle 2). Die Transfektionseffizienz wurde mittels des Green-fluorescence-Protein-Plasmids oder mit der siFITC Block-it (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) für Plasmid respektive siRNA Transfektionen protokolliert. Durch das Mikroskopieren unter den UV-Filter konnte so der Transfektionserfolg in jedem Versuch ermittelt werden.

Tabelle 2: Lipofectamine™ 2000 Protokoll für die Transfektion auf 6 well Kulturplatten

Kulturgefäß	Medium (µl)	DNA(µg)	RNA(nM)	OptiMEM(µl)	Lipofectamine(µl) in OptiMEM (µl)
96	100	0,3	40	25	0,6 in 25
48	300	0,6	40	25	1,2 in 25
24	500	1,2	40	50	2 in 50
6 well	1200	4,8	40	200	9,6 in 200

3.1.3 Die stabile Transfektion

Zur Etablierung der siRNA wurden die A549 Zellen mit einem Luciferase exprimierenden Reporter Plasmid ohne regulatorisches Element stabil transfiziert. Dazu wurde ein pMG-Plasmid verwendet, indem ein Resistenzgen gegen Hygromycin B mit der Multiple-Cloning-Site 1 (MCS1) verknüpft ist. In die MCS1 wurde das Luciferase Gen kloniert. Im Versuch wurden die Zellen zu 20.000 je well auf 24well- Platten ausgesät, dann wie oben beschrieben transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen trypsiniert, gezählt und 1000 Zellen pro well auf 24 well Platten wurden ausgesät. Nach einer 24 stündigen Adhärenzphase wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und frisches Kulturmedium mit 500µg/ml Hygromycin B zu den Zellen gegeben. Im Abstand von zwei Tagen erfolgten Medienwechsel, herangewachsene größere Kolonien aus einem Zellklon wurden in größere Zellkulturgefäße umgesetzt. Sobald genug Zellen eines Klons vorhanden waren, wurden diese auf 48well Platten ausgesät und per Reporter-Gen-Assay charakterisiert.

3.1.4 Isolation von primären humanen pulmonalarteriellen Fibroblasten

Bei den humanen Lungenpräparaten handelte es sich um Spenderlungen von Transplantationspatienten mit verschiedenen Krankheitsbildern. Wir unterteilten diese Präparate in die jeweiligen Erkrankung (IPAH, FPAH, CTEPH, Fibrose) und gesunde Spenderlungen als Referenzgruppe. Humane pulmonalarteriellen Fibroblasten wurden aus der

Arteria pulmonalis von gesunden Spenderlungen nach bereits im Labor etabliertem Protokoll präpariert (Rose et al., 2002; Krick et al., 2005; Eul et al., 2006). Die Pulmonalarterie wurde in ihrem Verlauf verfolgt und der kleinste noch präparierbare Teil wurde vorsichtig vom restlichen Gewebe isoliert und gesäubert. Im Anschluss wurden die Gefäßstücke zwecks Andauung für 20 Minuten bei 37 °C in 1,5 mg/ml Kollagenase (Worthington) in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) inkubiert und mit fetalem Kälberserum (FKS) abgestoppt. Die Arterienstücke wurden im Anschluss über Haltenadeln am Boden einer Petrischale befestigt und die intakte zugehörige Adventitia vorsichtig von der Media abgelöst. Damit das Gefäß nicht austrocknet fand die gesamte Isolation in HBSS statt. Nach erfolgter Trennung wurde der abpräparierte Teil in kleiner Stücke zerteilt und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ in HBSS mit 0,1 % BSA, 0,5 mg/ml Elastase und 1,5 mg/ml Kollagenase inkubiert. Nach der Zentrifugation und Entfernung der Enzymlösung am nächsten Morgen, wurden die angedauten Gefäßstücke in Medium aufgenommen und auf 6er Platten ausgesät. Als Medium wurde DMEM mit 10 % FKS gewählt, welches mit Glutamin, Penicillin und Streptomycin (je 1 ml pro 100 ml) supplementiert wurde. Der verbleibende Teil der Pulmonalarterie wurde zur Isolation von glatten Muskelzellen weiterverwendet.

3.1.5 Identifikation der Reinheit der Primärkultur

Um eine Kontamination der Primärkulturen mit Endothelzellen oder glatten Muskelzellen aus der Intima respektive Media auszuschließen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen für alpha-smooth-muscle-cell Aktin 1:400 (α -SMA) (Boehringer, Mannheim), von Willebrand Faktor (Abcam, Cambridge, UK) 1:100 und mit dem Fibroblast antibody [5B5] 1:100 (Abcam, Cambridge, UK), mit jeweils einer DAPI (4',6'-Diamidino-2-Phenylindol) Gegenfärbung durchgeführt. DAPI ist ein fluoreszierender DNA-Farbstoff, der seine Emission bei einer Wellenlänge von 461 nm im blauen Farbbereich hat und unspezifisch alle vorhandenen Zellkerne anfärbt. Der Rot-Fluoreszierende Cy3-konjugierte Sekundär-Antikörper gegen α -SMA, Fibroblast antibody [5B5] bzw. von Willebrand Faktor hingegen ermöglicht die Identifikation des jeweiligen Zelltyps, also glatte Muskelzellen, Fibroblasten bzw. Endothelzellen. Damit konnte die Kulturreinheit der PA-FB anhand der Cy3-positiven für 5b5 bzw. Cy-3 negativ für α SMA und von Willebrandt Faktor fluoreszierenden Zellen bestimmt werden. Die isolierten Zellen wurden direkt auf Objektträger mit 10 mm Durchmesser ausgesät und nach etwa fünf bis sieben Tagen angefärbt. Hierzu wurden sie mit PBS gewaschen und anschließend für 10 min in 95 % eiskaltem Ethanol fixiert. Nach gründlichem Waschen der Objektträger mit PBS wurde der jeweilige monoklonale Antikörper in einer 1:10 Verdünnung auf die Objektträger gegeben (je 250 μ l) und für eine Stunde bei

Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschgängen mit PBS wurden die Zellen mit 250 µl des Sekundärantikörpers (1:100 Verdünnung) für eine Stunde in Dunkelheit inkubiert. Als letzter Schritt nach erneutem Waschen mit PBS folgte schließlich die Färbung mit DAPI (5 µM in PBS) für 10 min in Dunkelheit. Durch Betrachtung der Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop unter 40-60 facher Vergrößerung wurden 5-10 Felder mit je 20-25 Zellen pro Feld ausgezählt, wobei die Bilder über ein Leica WinQ-System aufgenommen und bearbeitet wurden. In unseren Isolationen erreichten wir eine Kulturreinheit von 98-100 %. Da der Nachweis der einzelnen Zelltypen mit diesen Antikörpern nicht immer hoch spezifisch ist und Fibroblasten z.B. auch α -SMA exprimieren können, wurde darüber hinaus die Morphologie und das Wachstumsverhalten der Zellen zum Nachweis des jeweiligen Typs genutzt.

PBS (pH 7,5): 0,4 g KCl; 8,0 g NaCl; 0,3 g NaHCO₃; 1,0 g D-Glucose; 0,2 g EDTA; in 1 l dest. H₂O lösen; steril filtrieren und aufbewahren bei 4°C,

3.1.6 Transfektion der primären humanen pulmonalarteriellen Fibroblasten

Die Transfektion der PA-FB mit siRNA wurde mit Hilfe von Oligofectamine™ (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) durchgeführt. Es wurden jeweils 40nM siRNA als Endkonzentration in den Versuchen verwendet. Das Mischungsverhältnis von siRNA in OptiMEM bzw. Oligofectamine™ in OptiMEM wurde nach dem Standardprotokoll des Herstellers an die jeweils verwendete Plattenoberfläche angepasst. Exemplarisch findet sich am Ende dieses Absatzes eine Tabelle für die Transfektion einer 6 well Platte. Nach der Zugabe der Transfektionskomplexe wurden die Zellen für 24 Stunden inkubiert und im Anschluss für die jeweiligen Versuche weiterverarbeitet. Die Transfektionseffizienz wurde in einer zusätzlichen Gruppe jeweils mit der siFITC Block-it (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) kontrolliert. Hier ließ sich nach der Transfektion mittels UV-Lichts des Mikroskops der Transfektionserfolg beobachten.

Tabelle 3: Oligofectamine™ Transfektionsprotokoll für 6 well Kulturgefäße

Kultur- gefäß	siRNA im finalen OpitMEM Volumen pro well (µl)	Oligofectamine™ im finalen OpitMEM Volumen pro well (µl) zu (µl)	Kulturmedium (ohne FKS und ohne Antibiotika) (µl pro well)	Totales Volumen auf den Zellen (µl pro well)
96	16	0,5 zu 3	80	100
24	40	1,5 zu 7,5	250	250
12	85	2 zu 10	400	500
6 well	175	3 zu 15	800	1000

3.1.7 Die Kultivierung unter Normoxie und Hypoxie

Die Zellen wurden in gaskontrollierten Inkubatoren (Heraeus, Hanau) bei 5% CO₂ unter wasserdampfgesättigten normobaren Konditionen gehalten, wobei unter normoxischen Bedingungen Sauerstoff und Stickstoff atmosphärisch waren. Zur Erzeugung von hypoxischen Bedingungen wurde mit dem ProOX 110–System (BioSpherix, Redfield, USA), installiert in die oben genannten Inkubatoren, ein Sauerstoffgehalt von 1% (v/v) eingestellt. Sensorgesteuert wurde automatisch ein fertiges Gasgemisch aus 5,3 % CO₂ und Rest N₂ in das halboffene System zugeleitet, bis der vorhandene Sauerstoff auf das eingestellte Volumenprozent (hier 1%) verdrängt war. Das ProOX – System wurde regelmäßig mit 100% N₂, 100% O₂ und einem Gemisch von 1% O₂, 5% CO₂ Rest N₂ kalibriert.

3.2 Zellphysiologische Untersuchungen

3.2.1 Untersuchungen der Proliferation

3.2.1.1 Zellzyklus-Analyse

Die Zellzyklus-Analyse detektiert den DNA-Gehalt der Zellen anhand des Einbaus von Propidiumjodid, wodurch eine prozentuale Verteilung der Zellen in der G1-, S- und G2/M-Phase möglich ist. Die Messungen wurden mit dem FACSCalibur (Beckton Dickinson USA) ausgestattet mit der Cellquest-Software durchgeführt. Die Zellen wurden trypsinisiert und für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert mit anschließender Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Mindestens 5×10^6 Zellen mussten in 1 ml PBS resuspendiert und dann in 5 ml 80%igem Alkohol fixiert werden. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt mit 1500 rpm für 5 min wurde der Überstand entfernt und für 10 min 350 µl RNase-Lösung auf die Zellen gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 5 µg/ml Propidiumjodid.

Dieser Ansatz wurde für 10 min und bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, bevor die durchflusszytometrische Auswertung begann.

3.2.1.2 5-Bromodeoxyuridin (BrdU)- Assay

Der BrdU Assay funktioniert auf der Grundlage einer immunzytochemischen Detektion von BrdU, das in die zelluläre DNA eingebaut wird. Bei diesem Assay werden die Zellen in Kulturgefäße mit 96 Vertiefungen ausgesät (1000 Zellen und 100 µl Medium pro Vertiefung) und 24 Stunden in Kulturmedium kultiviert, damit sie adhärent werden. Es folgt ein Mediumwechsel zum serumfreien Kulturmedium und die Exposition in Normoxie und Hypoxie. Anschließend erfolgte die Zugabe von BrdU (Endkonzentration von 10 µM) und eine weitere Inkubation von 18 Stunden, wobei das BrdU in die chromosomale DNA eingebaut wird. Hiernach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen durch die Zugabe von 200 µl/Vertiefung Fixierungs-/Denaturierungslösung (Boehringer, Mannheim) bei Raumtemperatur fixiert. Nach gründlicher Entfernung der Fixierungslösung wird Anti-BrdU-POD hinzu gegeben, der nach entsprechender Inkubationszeit mit Hilfe von Waschpuffer (300 µl/Vertiefung) entfernt wird. Die Menge des inkorporierten BrdU kann durch Anti-BrdU-POD und der entsprechenden Tetramethylbenzidin-Substratlösung (Boehringer) aus dem Kit (5-30 min bei Raumtemperatur) nachgewiesen werden. Die Farbentwicklung kann durch die Gabe von 25 µl 1 M Schwefelsäure (etwa eine Minute auf dem Schüttler bei 300 rpm) gestoppt werden. Die Absorption wurde in einem ELISA-Reader (Behring-Werke, Marburg) bei 450 nm gemessen. Alle Ergebnisse einschließlich der Negativproben sind die Mittelwerte von Triplets.

3.2.1.3 [3H]Thymidin-Assay

Die Proliferation der Zellen wurde über den Einbau an ³[H]-markiertem Thymidin (ICN, Eschwege) gemessen. Die Zellen wurden mit 20.000 Zellen pro well auf 24er Kulturplatten ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und das normale Kulturmedium wurde durch serumfreies Medium ersetzt. Im Anschluss an diese Synchronisationsphase erfolgte die Exposition in Normoxie bzw. Hypoxie. 16 Stunden vor Versuchsende, wurde den Zellen in den 24er-well Kulturplatten, pro well 1 µCi ³[H]-Thymidin zugesetzt. Die Zugabe erfolgte steril und die Zellen wurden anschließend weiter in Normoxie bzw. Hypoxie inkubiert. Am Versuchsende wurde die Zellen trypsiniert, zentrifugiert und in die Szintillationsröhrchen überführt. Anschließend wurde ihnen Szintillationsflüssigkeit zugesetzt und die verursachte Szintillation in einem β-Counter (LS 1801 Szintillationszähler,

Beckmann, München) gemessen. Als Maß für die Proliferation gelten die gezählten Ereignisse pro Minute (cpm).

3.2.1.4 Zellzählung

Zur Messung der Proliferation in der Zellzählung wurden die Zellen auf 24er Kulturplatten zu 20.000 Zellen pro well ausgesät. Nach der Adhärenz- und Synchronisationsphase erfolgte die Exposition in Normoxie bzw. Hypoxie für die jeweilig gewünschte Zeit (z.B. 24 Stunden). In den Transfektionsversuchen wurde die Transfektion nach der Adhärenzphase und vor der Synchronisationsphase durchgeführt. Am Versuchsende wurden die Zellen auf der Kulturplatte trypsiniert, mit FKS gestoppt und das Volumen pro well wurde mit Kulturmedium auf 500 µl pro well aufgefüllt. Die Zellzahl pro well wurde mit einer Zählkammer nach Neubauer am Mikroskop gezählt. Das Produkt aus dem Mittelwert von acht ausgezählten Quadranten und dem Faktor 10^4 ergab die Zelldichte in der Suspension (Zellen/ml).

3.2.2 Apoptose Assay

Die Doppelfärbung mit Propidiumjodid und Annexin ermöglicht die Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen. Annexin bindet an Phospholipide, welche in apoptotischen Zellen an der extrazellulären Seite der Zellmembran präsentiert werden. Propidiumjodid kann hingegen nur die Zellmembran von nekrotischen Zellen passieren. Nach Ablauf der Kultivierung unter Normoxie und Hypoxie (24 Stunden) wurden die Zellen geerntet und gewaschen wie für die Zellzyklusanalyse (siehe 3.2.1.1). Danach erfolgte die Färbung mit Propidiumjodid (1 µg/ml) und Annexin V. Dazu wurde zunächst ein Inkubationspuffer angesetzt (10 mM Hepes/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂). Dem Inkubationspuffer wurde anschließend die Annexin-V-Fluos Markierungslösung zugefügt (Verdünnung von 20 µl Annexin-V-Fluos Stammlösung in 1000 µl Inkubations-Puffer und hinzufügen von 20 µl der 50 µg/ml Propidiumjodid Stammlösung). Von der Annexin/Propidiumjodid Färbelösung wurden 100 µl pro Zellpellet verwendet. Die gefärbten Zellen wurden mittels FACS Calibur Zytometer untersucht: Die Prozentanteile der nekrotischen, apoptotischen und lebenden Zellen wurden mit Hilfe der CellQuest Software (Becton Dickinson) errechnet. Auf der x-Achse wurde der Logarithmus des Annexin Signals, auf der Y-Achse logarithmisch die Propidiumjodid-Fluoreszenz dargestellt. Im linken unteren Quadranten erschienen die unmarkierten Zellen bzw. vitalen Zellen, im rechten unteren Quadranten die Annexin V positive Zellen bzw. apoptotische Zellen und im linken und

rechten oberen Quadranten die Annexin V und Propidiumjodid positive Zellen bzw. nekrotische Zellen.

3.2.3 Migrations-Assay

Die Migrationsexperimente wurden in der modifizierten Boyden-Kammer durchgeführt, um die Anzahl der migrierten PA-FB quantitativ bestimmen zu können. Wie in Abbildung 7 schematisch skizziert, besteht die modifizierte Boyden-Kammer aus zwei übereinander befindlichen Kammern, getrennt durch eine Porenmembran. Die Zellsuspension mit einer zuvor definierten Zellzahl wurde in die obere Kammer gegeben und im Anschluss in Normoxie oder Hypoxie für 24h inkubiert. Am Versuche wurde die obere Zellschicht durch einen Zellschaber entfernt und die zur unteren Seite der Porenmembran migrierten Zellen mit Kristall-Violett gefärbt und im Lichtmikroskop gezählt. Zur Vorbereitung der Migrationsexperimente wurden Polyethylene Terephthalate (PET)-Migrationskammern mit einer Porengröße von 8,0 μm in 24-Lochplatten gegeben. Die PA-FB wurden von 6 well Platten trypsiniert, wie oben beschrieben gezählt und mit 2000 Zellen pro well in die obere Kammer pipettiert. Für die Transfektionsexperimente wurden die Zellen 24h zuvor auf den 6well Kulturplatten wie oben beschreiben transfiziert. In beiden Kammern wurde normales Kulturmedium pipettiert, ohne zusätzliche Stimulation, außer in der Positivkontrolle. Hierzu wurde dem Kulturmedium der unteren Kammer Angiotensin II (1 μM) zugegeben, ein aus der Literatur bekannter Stimulus für PA-FB zur Migration (Krick et al., 2005).

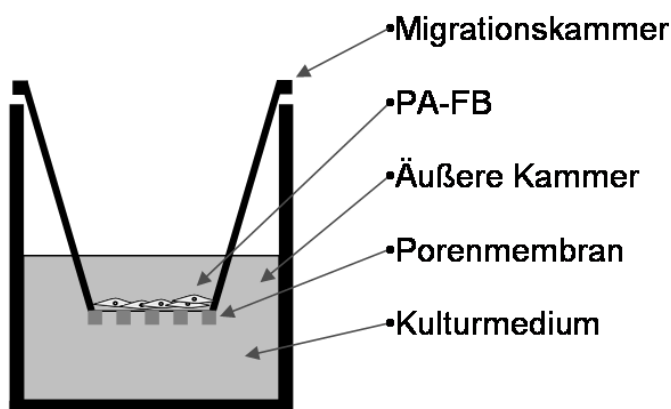


Abbildung 7: Schematische Darstellung der modifizierten Boyden Kammer zur Untersuchung der Migration PA-FB

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Verwendete Plasmide

Der *pMG-Vektor* (Invivogen, Toulouse, Frankreich) wurde zur Transfektion der Sequenz für Green-Fluorescent-Protein (GFP) sowie zur Transfektion des Luciferase-Gens genutzt. Dieser Vektor enthält einen CMV Promoter, der für eine hohe Transkriptionsrate der eingesetzten Sequenz sorgt. Mittels des GFP-Plasmides erfolgte die Bestimmung der Transfektionseffizienz in den einzelnen Versuchen. Weiterhin enthält dieser Vektor ein Gen für eine Resistenz gegen Hygromycin B gekoppelt an die multiple-cloning-site1 (MCS1). Somit wurde durch die Klonierung des Luciferase-Gens in die MCS1 ein Plasmid erzeugt, was in den Zellen sowohl Luciferase als auch die Hygromycin-B Resistenz exprimiert. Mit Hilfe dieses Plasmides wurden die A549 Zellen stabil transfiziert (siehe Ergebnisteil 4.2). Weiterhin wurde *pGL3-basic-Vektor* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) verwendet. Da diesem Vektor eukaryotische Promoter- und Enhancer-Sequenzen fehlen ist er geeignet zur Analyse von definierten regulatorischer Sequenzen, die an die vorgegebene Stelle hinein kloniert werden. In dieser Arbeit wurden fünf Wiederholungen einer Hypoxie-sensitiven Sequenz (5'-GCC CTA CGT GCT GTC TCA-3'), dem Hypoxia-responsive-element (HRE), aus der Phosphoglyceratkinase (PGK) kloniert. Als Promotor wurde ein Thymidin-Kinase Minimalpromotor (PGK-HRE-TKmp) in den *pGL3-basic-Vektor* vor das Luciferase Gen kloniert.

3.3.2 siRNA

Die in dieser Arbeit verwendeten siRNA-Sequenzen sind in der Tabelle 4 aufgeführt. Sie wurden mit Hilfe der HUSAR- (Heidelberg- Unix- Sequence- Analysis- Resource) Software und dem *find pattern program* nach der AA-N₁₉ Regel siRNA- Motive für humanes HIF-1 α und HIF-2 α selektiert. *Forward*- und *reverse*- Strang wurden mit zwei Desoxy-Thymidinüberhängen am 3'- Ende synthetisiert (Biospring, Frankfurt) (Elbashir et al., 2001). Die RNA Duplexe wurden *annealed* zu einer Endkonzentration 20 μ M durch Erhitzen auf 95°C für eine Minute und im Anschluss für eine Stunde bei 37°C im *Annealing*-Buffer inkubiert.

Annealing-Buffer: 20 mM Kalium Acetat; 6 mM HEPES-KOH; pH 7.4; 0.4 mM Magnesium Acetat

Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten siRNAs

siRNA	Richtung	Sequenz
siHIF-1 α	Forward	ugu gag uuc gca ucu uga u <i>dt</i> <i>dt</i>
	Reverse	auc aag aug cga acu cac a <i>dt</i> <i>dt</i>
siHIF-2 α	Forward	guc agc cac cug gaa ggu c <i>dt</i> <i>dt</i>
	Reverse	gac cuu cca ggu ggc uga c <i>dt</i> <i>dt</i>
si-random	Forward	uac acc guu agc aga cac c <i>dt</i> <i>dt</i>
	Reverse	ggg guc ugc uaa cgg ugu a <i>dt</i> <i>dt</i>
si-luciferase	Forward	cuu acg cug agu acu ucg a <i>dt</i> <i>dt</i>
	Reverse	ucg aag uac uca gcg uaa g <i>dt</i> <i>dt</i>

3.3.3 Luciferase Detektion

3.3.3.1 Luciferase-Reporter Messung

Luciferase ist ein Protein, das erstmalig in Glühwürmchen entdeckt wurde. Es oxidiert Luciferin in Anwesenheit von ATP, Luftsauerstoff und Magnesium-Ionen und führt so zu einer enzymkatalysierten Chemolumineszenz, die bei 562 nm gemessen werden kann. Für die stabile Transfektion der Luciferase in A549 Zellen wurde wie oben beschrieben der pMG Plasmid mit der Hygromycin B Resistenz verwendet. Nach der Selektion wurden die Zellen in verschiedenen Zelldichten auf 48well Kulturplatten (10.000, 20.000 und 30.000) ausgesät. Nach einer 24 stündigen Adhärenzphase wurde der Versuch gestoppt. Dazu wurden die Zellen auf Eis mit kaltem PBS gewaschen, mit 67 μ l Cell Culture Lysis Reagent (Promega, Mannheim) 15 Minuten geschüttelt und dann bei -80°C über Nacht eingefroren. Die Zellen wurden zur vollständigen Lyse bei Raumtemperatur aufgetaut und erneut bei -80°C eingefroren. Zur Messung wurden pro Probe 100 μ l *Luciferase Assay Reagent* (Luciferase Dual Reporter Assay Kit, Promega, Mannheim), jeweils frisch aus dem gefriergetrockneten Substrat Luciferin und dem Luciferase Assay Buffer hergestellt, in ein well einer 96er well Messplatte vorgelegt, wozu möglichst zügig 20 μ l des Zelllysates gegeben wurden. Die nun im Luminometer (TEKAN, Crailsheim) messbare Chemolumineszenz korreliert mit der Luciferase Aktivität und wird in *Relative Light Units* (RLU = relative Lichteinheiten) angegeben.

3.3.3.2 Hypoxie-responsives Element Reporter-Gen Assay

Es wurde das Dual-Luciferase®-Reporter Assay System der Firma Promega verwendet. Der Ausdruck “dualer Reporter” bezieht sich auf die gleichzeitige Expression und Messung

zweier unterschiedlicher Reporterenzyme innerhalb eines Systems. Als “experimenteller Reporter” wurde wie oben beschrieben das Hypoxie-responsive Element in den *pGL3-basic-Vektor* kloniert, welches die *firefly*-Luciferase exprimiert. Ein für eine *Renilla*-Luciferase kodierendes Reportergen diente als interne Kontrolle. Die Expression der *Renilla*-Luciferase wird unter einem konstitutiven CMV-Promotor reguliert. Der pRL-CMV Vektor wurde von Promega bezogen. Die *firefly*-Luciferase und die *Renilla*-Luciferase haben aufgrund ihrer unterschiedlichen evolutionären Herkunft unterschiedliche Enzymstrukturen und Substratanforderungen. Somit ist es möglich, die Lumineszenz der *firefly*-Luciferase-Reaktion (“experimenteller” Reporter) zu stoppen, während gleichzeitig die Lumineszenzreaktion der *Renilla*-Luciferase (Kontroll-Reporter ohne regulatorisches Element) aktiviert wird. Die A549 Zellen wurden transient mit 0,3 µg pro 48er well HRE-Plasmid (*firefly*-Luciferase), 0,06 µg pro 48er well pRL-CMV (*Renilla*-Luciferase) in Kombination mit 40 nM der jeweiligen siRNA transfiziert. Nach acht Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal gewaschen und serumfreies Medium wurde zugegeben. Es folgte die Exposition in Normoxie bzw. Hypoxie für 24 Stunden. Am Versuchsende wurden die Zellen wie oben beschrieben gestoppt und gemessen. Die Messung der *Renilla*-Luciferase erfolgte im Anschluss an die *firefly*-Luciferase Messung im gleichen Reaktionsgefäß durch die Zugabe von 20 µl *Stop & Glo™ Reagent* (Luciferase Dual Reporter Assay Kit, Promega, Mannheim). Die Ergebnisse wurden als Quotient aus *firefly*-Luciferase durch *Renilla*-Luciferase angegeben und somit auf die Transfektionseffizienz im Versuch normalisiert.

3.3.3.3 Immunzytofluoreszenz

Die mit dem Luciferase-Plasmid stabil transfizierten Zellen wurden mit 20.000 Zellen pro well auf gekammerte Objektträger (chamber slides) ausgesät. Nach 24 Stunden Adhärenz erfolgte die Fixierung mit Aceton und Methanol im Verhältnis 1:1. Die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen wurde mit 3%igen bovinen Serumalbumin für drei Stunden durchgeführt. Im Anschluss wurde der polyklonale Anti-Luciferase pAb (Promega, Mannheim) aus der Ziege im Verhältnis 1:500 in PBS auf die Zellen gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die indirekte Immunfluoreszenz wurde durch einen Alexa 488-IgG-Anti-Ziege Sekundärantikörper (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) 1:1000 in PBS verdünnt erreicht. Zuletzt erfolgte die Kofärbung mit DAPI, wie unter 3.1.5 beschrieben. Nach dem Eindecken der Objektträger wurde die Fluoreszenz mit einer an das Mikroskop (Leica DMLA Q550/W, Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) angeschlossenen Digitalkamera (DC 300 FX, Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) mit den jeweiligen Filtern aufgenommen. Die Bearbeitung und Auswertung erfolgte über mit einen

mit dem Mikroskop vernetzten Computer mit der Bildbearbeitungssoftware Leica Q-Win (Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Bensheim). Die jeweiligen installierten Filter waren der Blau-(A, Wellenlänge: 380-420), der Grün-(I3, Wellenlänge: 420-515) und der Rotfilter (N2.1, Wellenlänge: 500-590).

3.3.4 Real time Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.3.4.1 RNA Isolation

Zur Isolation der RNA wurden die A549 Zellen bzw. die PA-FB zunächst auf 6well Kulturplatten ausgesät und wie unter 3.1.2 bzw. 3.1.6 beschrieben transfiziert. Nach Ablauf der Transfektion und der Inkubationszeit in Normoxie oder Hypoxie wurden die Zellen zweimal auf Eis mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde 400 µl RNAzol (WAK-Chemie, Steinbach/ Taunus) pro well, einem Guanidin-Thiocyanat-Phenol-Gemisch, zugegeben und die Zellen somit lysiert. Das Zelllysate wurde in durchsichtige 1,5 ml Cups überführt, kurz in Flüssigstickstoff heruntergekühlt und dann bei -80°C aufbewahrt. Zur Isolation wurden die Proben auf Eis aufgetaut. Es erfolgte die Zugabe von 40 µl Chloroform pro Probe mit 15 minütiger Inkubation auf Eis. Dann wurden die Proben mit 14000 g bei 4°C 15 Minuten zentrifugiert, die obere, wässrige, RNA- haltige Phase vorsichtig abgenommen, in weiteres Eppendorf-Cup überführt. Zur Fällung wurde die gleiche Menge Isopropanol zugegeben und die Probe geschüttelt und erneut 15 Minuten auf Eis stehen gelassen. Die Proben wurden wieder wie oben beschrieben zentrifugiert und der resultierende Überstand wurde verworfen. Es folgte ein Waschvorgang mit 200 µl 70% Ethanol. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand wieder verworfen und das entstandene Pellet ließ man bei Raumtemperatur trocknen. Nach der Trocknung wurde das Pellet abschließend in 20 µl Aqua bidest eluiert.

3.3.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit

Zur Überprüfung der Qualität und Quantifizierung der RNA wurde eine spektrophotometrische Messung (Uvikon 922 Spectrophotometer, Kontron AG, Eching) durchgeführt. Hierzu wurde die RNA mit RNase-freiem-H₂O 1:50 verdünnt und die Extinktion bei $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$ gemessen. Der RNA-Gehalt wurde unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe und der Absorption des Wassers auf die RNA-Proben hochgerechnet. Der Quotient der Messung bei $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$ und bei $\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$ diente als Maß für die Reinheit der RNA. Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, kleinere Werte sprechen für eine Verunreinigung mit Proteinen. Für die Konzentrationsberechnung gilt: E 260 = 1 entspricht bei dsDNA 50 µg/ml

E 260 = 1 entspricht bei ssDNA oder RNA 40 µg/ml

E 260 = 1 entspricht bei Oligonukleotiden 20 µg/ml

Zusätzlich wurden je 5 µl RNA mit 5 µl Bromphenolblau-Puffer gemischt und standardisiert gelelektrophoretisch untersucht. Dabei sollten die 28s und 18s rRNA als klare Banden zu erkennen sein. Bei schlechter Qualität wurde die Probe verworfen.

3.3.4.3 Herstellung der cDNA

Es wurde für jede Probe aus der Konzentration das Volumen errechnet, welches 2 µg RNA entsprach. In einem PCR-Gefäß wurde dieses Volumen mit Aqua bidest auf 10 µl ergänzt und 0,5 µl DNase (DNase I, RNase free, 10U/µl Roche, Mannheim) zugegeben, worauf die jeweiligen Gefäße im PCR-Cycler (iCycler 96 well reaction module, Bio-Rad, München) 30 Minuten bei 37°C inkubierten. Folgend wurde bei 72°C 7 Minuten lang die DNase inaktiviert und die RNA denaturiert. Währenddessen wurde folgender Mastermix für die Reverse Transkription vorbereitet:

Tabelle 5: Mastermix für die Reverse Transkription Kalkulation je RNA-Probe

First Strand Buffer 5 fach (MMLV-RT-Kit, Invitrogen)	4µl
0,1M Dithiothreitol (0,1M DTT, MMLV- RT- Kit, Invitrogen)	2µl
dNTP- Mix (jedes Nucleotid 10mM) (F-560L, Finnzymes, Espoo, Finnland)	1µl
RNase- Inhibitor (peqGold RNase Inhibitor Plus 30U/µl, peqLab)	1µl
MMLV– Reverse Transkriptase (200U/µl, Invitrogen)	1µl
Random Primer (p(dn) ₆ , Roche, Mannheim)	1µl

Von diesem Mastermix wurden jeweils 10 µl zu den einzelnen RNA-Ansätzen gegeben. Zur Negativkontrolle wurden parallel Proben mit einem Mastermix, bei dem die Reverse Transkriptase durch Aqua bidest ersetzt wurde, angesetzt. Anschließend wurden die Proben zur cDNA- Synthese eine Stunde bei 39°C inkubiert. Zum Schluss folgte die Inaktivierung der zugesetzten Enzyme durch Erwärmung auf 96°C für 2 Minuten.

3.3.4.4 Durchführung der *real time* PCR

Das Prinzip der *real-time* PCR beruht auf dem Einsatz eines hoch sensitiv an DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffes, der sich in die Furche der sich bildenden, doppelsträngigen DNA einlagert. Gemessen wird die Intensität der Fluoreszenz, die dann gegen die Zykluszahl aufgetragen wird. Es wird ein Schwellenwert definiert, an dem die spezifische Fluoreszenz

den Hintergrund deutlich überschreitet und welcher in der Phase der exponentiellen Amplifikation liegt. Die Anzahl der Zyklen, die durchlaufen werden müssen, um diesen Schwellenwert zu erreichen, bezeichnet man als CT-Wert. Daraus wird unter Einbeziehung eines Referenzgens die relative Expression des untersuchten Gens kalkuliert. Zur Durchführung der *real time*-PCR wurde verdünnte cDNA wie oben beschrieben benutzt. Als Bezugspunkt dient ein nicht reguliertes Gen (*house keeping gene*), hier Porphobilinogendeaminase (PBGD). Zur Reaktion wurden jeweils 2 µl der cDNA-Lösung mit dem Platinum SYBRGreen qPCR SuperMix UDG (Invitrogen) zu einem Endvolumen von 25 µl angesetzt. Die PCR erfolgte mittels Sequence Detection System 7700 (PE Applied Biosystems, Foster City, USA). Nach einer sechsminütigen Erhitzung auf 95°C erfolgten 45 Zyklen zu je 95°C für 5 Sekunden, 59°C für 5 Sekunden und 72°C für 10 Sekunden. Da SYBRGreen I unspezifisch doppelsträngige DNA färbt, wurde zur Kontrolle der Reinheit der PCR-Produkte die Schmelzkurve bestimmt. Die statistische Auswertung wurde folgendermaßen durchgeführt: Zuerst wurde die Differenz der CT-Werte von PBGD und dem jeweilig untersuchten Gen gebildet, was dem Δ CT Wert entspricht. Die Regulation der jeweiligen Gene wurde nach der $\Delta\Delta$ CT Methode zur Kalkulation der relativen Veränderungen berechnet (Livak and Schmittgen, 2001).

Tabelle 6: Verwendete Primer

Primer	Richtung	Sequenz
PBGD	Forward	5' AGGATGGGCAACTGTACCTG 3'
	Reverse	5' AAACCAGTTAATGGGCATCG 3'
HIF-1α	Forward	5' AGATCTCGGCGAAGTAAAGAGTCTGAAGT 3'
	Reverse	5' AGCATCCTGTACTGTCCTGTGGTGAAGTGT 3'
HIF-2α	Forward	5' GCTGAGTGAGATCGAGAAGAACGACGTGGT 3'
	Reverse	5' TCCTGCTTTCCAAGTCTGCGGGTACTTAT 3'
HO-1	Forward	5' ATGACACCAAGGACCAGAGC 3'
	Reverse	5' AGACAGCTGCCACATTAGGG 3'
PGK	Forward	5' CCCTGGCAAATGCTTCCCATTCAAATACC 3'
	Reverse	5' TCATCCTCCTGGAGAACCTCCGCTTTCAT 3'
VEGFR2/KDR	Forward	5' ATTGGAGTGCAAACCGGTAG 3'
	Reverse	5' GCCTAGAAGACTGGCTCCCT 3'
VEGF	Forward	5'GGA GTG TGT GCC CAC CGA GGA GTC CAA C 3'
	Reverse	5'GGT TCC CGA AAC CCT GAG GGA GGC T 3'

3.3.5 Proteinanalytik

3.3.5.1 Proteinisolierung

Für den Western- Blot wurden die Zellen auf 6well-Kulturgefäße ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation in Normoxie bzw. Hypoxie (mit bzw. ohne vorherige Transfektion) wurde zweimalig mit eiskalter 1x phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und 100 µl Lämmli- Puffer pro well hinzu gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und in Eppendorfgefäße überführt, welche kurz in flüssigem Stickstoff gefroren und dann bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt wurden.

4x Lämmli-Puffer: 4 ml 10% Sodiumdodecylsulfat; 2,3 ml 87% Glycerol; 1,2 ml 1M Tris pH 6,8; 2 ml 1 M Dithiothreitol; 1 Spatelspitze Bromphenolblau; mit Aqua bidest auf 10 ml ergänzen und aliquotiert; bei -20°C aufbewahren

3.3.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS- PAGE werden Proteine mit dem Detergenz Sodiumdodecylsulfat solubilisiert, denaturiert und bekommen unabhängig vom ursprünglichen sauren oder basischen pH-Wertes des Proteins eine negative Gesamtladung. Dadurch wird ein einheitliches Verhältnis von Ladung zur Masse erreicht, wodurch die Proteine in einem Gel bei Anlegen eines elektrischen Feldes Richtung Anode wandern und so elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt werden können.

- **Alpha-smooth muscle cell-Aktin (α SMA) und β - Aktin**

Die Proben wurden für 10 Minuten bei 85°C im Hitzeblock denaturiert, während man die Geltaschen des Polyacrylamid- Fertiggels (Novex 16% Tricine Gel, Invitrogen) mit Laufpuffer ausspülte.

Laufpuffer (Blotpuffer): 121,14 g 1 M Tris; 179,17 g 1 M Tricine; 100 ml 10% Sodiumdodecylsulfatlösung mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen

Je 20 µl der Proben wurde in eine Geltasche pipettiert, als Größenmarker wurden 10 µl SeaBlue Plus 2 (4-250 kDa, Invitrogen) verwandt. Die Proben wurden bei 100 Volt, 500 mA und 150 Watt ungefähr anderthalb Stunden laufen gelassen.

- **HIF-1 α und HIF-2 α**

Die Proben wurden 5 Minuten bei 95°C denaturiert, dann 20 µl pro Tasche auf einem Polyacrylamidgel (7,5% Trenngel, 4% Sammelgel) bei 100 V laufen gelassen. Als

Größenmarker wurde RPN 800 (10- 250 kDa, Amersham Biosciences Europe, Freiburg) eingesetzt, ansonsten wurde wie beim α -SMA und β -Aktin verfahren (siehe oben).

3.3.5.3 Elektroblothing

Die Proteine des Gels wurden im *semidry*-Verfahren elektrophoretisch auf eine Membran übertragen, um sie dort mit Antikörpern identifizieren zu können. Ein Polyvinylidendifluoridmembran (Immobilon) wurde mit Methanol benetzt, mit demineralisiertem Wasser gespült und dann in Blotpuffer überführt.

Western-Blot Puffer: 3,03 g Tris; 14,4 g Glycin; 200 ml Methanol; 1 ml 10% SDS-Lösung; mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen

Auf die untere Elektrode wurde zuerst ein mit Puffer befeuchtetes Blottingpapier (Gel-Blotting- Paper; Whatman) gelegt, dann die Membran, das Gel und dann noch ein Blatt Blottingpapier. Danach wurde die Kathode mit 300 V bei 2 mA/cm² und 150W für eineinhalb Stunden angesetzt. Nach Spülen mit NET-Gelatine wurden die unbesetzten Proteinbindungsstellen der Membran zwei Stunden lang in NET-Gelatine geblockt.

10x NET Puffer: 87,66 g NaCl; 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; 500 ml Tris pH 7,4; 5 ml Triton X- 100; mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen

NET-Gelatine: 2,5 g Gelatine; 100 ml NET- Puffer; mit Aqua bidest. auf 800 ml auffüllen

3.3.5.4 Immunologische Darstellung der Proteine

Der Primär- Antikörper wurde 1:10.000 in NET-Gelatine verdünnt und mit der Membran über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde dreimal 10 Minuten lang mit NET-Gelatine gewaschen, bevor der in NET-Gelatine verdünnte biotinylierte sekundäre Antikörper zugegeben wurde. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut dreimalig 10 Minuten mit NET-Gelatine gewaschen. Dann wurde die Membran eine Stunde nach Herstellerprotokoll in NET-Gelatine verdünntem Biotin-Streptavidin-horseradishperoxidase- Komplex (AB-Komplex/ HRP, DakoCytomation, Hamburg) inkubiert. Wieder wurde dreimal mit NET-Gelatine gewaschen, bevor 5 Minuten mit ECL (Enhanced-Chemo-Lumineszenz)-Reagenz (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Pierce, Rockford, USA) inkubiert und dann die Chemolumineszenz gemessen wurde (Fluorchem 8900 Chemi- Luminescence Imager).

Tabelle 7: Für Western Blot Analysen verwendete Antikörper

Primärer Antikörper		Sekundärer Antikörper	
α- smooth muscle cell-Aktin Anti-human-(monoclonal)-mouse (Boehringer, Mannheim)	1:1.000	Sheep Anti-Mouse IgG - Horseradish Peroxidase (Amersham Pharmacia)	1:10.000
HIF-1α Anti-human-(monoclonal)-mouse (BD Biosciences, Heidelberg,)	1:1.200	Sheep Anti-Mouse IgG - Horseradish Peroxidase (Amersham Pharmacia)	1:10.000
HIF-2α Anti-human-(monoclonal)-mouse (Novus Biologicals, Littleton, USA)	1:12.000	Sheep Anti-Mouse IgG - Horseradish Peroxidase (Amersham Pharmacia)	1:10.000
β- Aktin Anti-human-(monoclonal)-mouse (Abcam, Cambridge, UK)	1:20.000	Sheep Anti-Mouse IgG - Horseradish Peroxidase (Amersham Pharmacia)	1:10.000

3.3.5.5 Immunzytofluoreszenz

Die A549 Zellen bzw. PA-FB wurden auf gekammerte Objektträger mit jeweils 20.000 Zellen pro Kammer ausgesät. Nach der Adhärenzphase (über Nacht) wurden die Zellen wie oben beschrieben transfiziert. Nach der Inkubation der Transfektionskomplexe wurden die Zellen gewaschen und mit serumfreien Medium für 24 Stunden unter Normoxie bzw. Hypoxie weiter kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Fixierung mit Acetone und Methanol (1:1). Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit 3%igen bovinen Serumalbumin angewendet über eine Stunde blockiert. Die primären Antikörper (HIF-1 α Anti-human-(monoclonal)-mouse 1:100; HIF-2 α Anti-human-(monoclonal)-mouse 1:500) wurden mit PBS verdünnt, auf die fixierten Zellen gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die indirekte Immunfluoreszenz wurde durch die folgende Inkubation mit dem sekundären Antikörper Alexa 488-konjugierter anti-mouse-IgG- goat (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) erzielt. Der sekundäre Antikörper wurde 1:1000 in PBS verdünnt. Nach dem Eindecken der Objektträger erfolgte die mikroskopische Auswertung (LEICA).

3.4 Liste verwendeter Substanzen

Die in diesen Experimenten eingesetzten Substanzen wurden alle am Versuchstag frisch angesetzt.

3.4.1 Experimentelle Agenzien und Lösungsmittel

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-F12-Medium (Gibco Invitrogen, Paisley, United Kingdom)

Penicillin- Streptomycin (PAN- Biotech GmbH, Aidenbach)

nichtessentielle Aminosäuren (Gibco Invitrogen, Paisley, United Kingdom)

MEM- Vitamine (Gibco Invitrogen, Paisley, United Kingdom)

Glutamin (PAN- Biotech GmbH, Aidenbach)

fetales Kälberserum (Foetal Bovine Serum, PAA, Pasching, Österreich)

Trypsin (Trypsin- EDTA 100 fach konzentriert, PAN- Biotech GmbH, Aidenbach, mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf 1 fache Konzentration verdünnt)

Lipofectamine™2000 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California)

OptiMEM (Gibco Invitrogen, Paisley, United Kingdom)

siFITC Block-it (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California)

Hygromycin B (Roche Diagnostics Deutschland GmbH Mannheim)

Kollagenase (Worthington Biochemical Corporation Lakewood)

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)

alpha-smooth-muscle-cell Aktin 1:400 (α -SMA) (Boehringer, Mannheim)

von Willebrand Faktor (Abcam, Cambridge, UK)

Fibroblast antibody [5B5] 1:100 (Abcam, Cambridge, UK)

DAPI (4',6'-Diamidino-2-Phenylindol)

PBS (0,4 g KCl; 8,0 g NaCl; 0,3 g NaHCO₃; 1,0 g D-Glucose; 0,2 g EDTA; in 1 l dest. H₂O lösen; steril filtrieren und aufbewahren bei 4°C)

Oligofectamine™ (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California)

Propidiumjodid (Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor® 488 & Propidium Iodide (PI) - 250 assays - for Flow Cytometry, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California)

RNase-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim)

BrdU (Boehringer, Mannheim)

BrdU Fixierungs-/Denaturierungslösung (Boehringer, Mannheim)

Anti-BrdU-POD (Boehringer, Mannheim)

Tetramethylbenzidin-Substratlösung (Boehringer, Mannheim)

Schwefelsäure (Boehringer, Mannheim)

³[H]-markiertem Thymidin (ICN, Eschwege)

Annexin V (Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor® 488 & Propidium Iodide (PI) - 250 assays - for Flow Cytometry, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California)

Inkubationspuffer Apoptose Assay (10 mM Hepes/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂)

Angiotensin II (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim)

pMG- Vektor (Invivogen, Toulouse, Frankreich)

-basic-Vektor (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California)

Annealing-Buffer: (20 mM Kalium Acetat; 6 mM HEPES-KOH; pH 7.4; 0.4 mM Magnesium Acetat)

Cell Culture Lysis Reagent (Promega, Mannheim)

Luciferase Assay Reagent (Luciferase Dual Reporter Assay Kit, Promega, Mannheim)

Stop & Glo™ Reagent (Luciferase Dual Reporter Assay Kit, Promega, Mannheim)

Anti-Luciferase pAb (Promega, Mannheim)

RNAzol (WAK-Chemie, Steinbach/ Taunus)

Bromphenolblau-Puffer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim)

DNase (DNase I, RNase free, 10U/μl Roche, Mannheim)

Platinum SYBRGreen qPCR SuperMix UDG (Invitrogen)

4x Lämmli-Puffer: 4 ml 10% Sodiumdodecylsulfat; 2,3 ml 87% Glycerol; 1,2 ml 1M Tris pH 6,8; 2 ml 1 M Dithiothreitol; 1 Spatelspitze Bromphenolblau; mit Aqua bidest auf 10 ml ergänzen und aliquotiert; bei -20°C aufbewahren

Sodiumdodecylsulfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim)

Polyacrylamid- Fertiggels (Novex 16% Tricine Gel, Invitrogen)

Laufpuffer (Blotpuffer): 121,14 g 1 M Tris; 179,17g 1 M Tricine; 100 ml 10%

Sodiumdodecylsulfatlösung; mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen

SeaBlue Plus 2 (4-250 kDa, Invitrogen)

RPN 800 (10- 250 kDa, Amersham Biosciences Europe, Freiburg)

Polyvinylidendifluoridmembran (Immobilon; Merck KGaA, Darmstadt)

Western-Blot Puffer: 3,03 g Tris; 14,4 g Glycin; 200 ml Methanol; 1 ml 10% SDS-Lösung; mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen

Blottingpapier (Gel- Blotting- Paper; Whatman)

10x NET Puffer: 87,66 g NaCl; 100 ml 0,5 M EDTA; pH 8,0; 500 ml Tris pH 7,4; 5ml Triton X- 100 mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen

NET-Gelatine: 2,5 g Gelatine; 100 ml NET- Puffer; mit Aqua bidest. auf 800 ml auffüllen

Biotin-Streptavidin-horseradishperoxidase- Komplex (AB- Komplex/ HRP, DakoCytomation, Hamburg)

ECL (Enhanced-Chemo-Lumineszenz)-Reagenz (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Pierce, Rockford, USA)

α - smooth muscle cell-Aktin Anti-human-(monoclonal)-mouse (Boehringer, Mannheim)

HIF-1 α Anti-human-(monoclonal)-mouse (BD Biosciences, Heidelberg,)

HIF-2 α Anti-human-(monoclonal)-mouse (Novus Biologicals, Littleton, USA)

β - Aktin Anti-human-(monoclonal)-mouse (Abcam, Cambridge, UK)

Sheep Anti-Mouse IgG - Horseradish Peroxidase (Amersham Pharmacia)

Alexa 488-konjugierter anti-mouse-IgG- goat (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

3.5 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) der Rohdaten angegeben. Die statistische Analyse wurde durchgeführt mittels paarigem oder unpaarigem t-Test oder ANOVA und anschließend Student Newman Keuls Test. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet ab $P < 0,05$, was einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % entspricht.

4 ERGEBNISSE

4.1 Übersicht

Den Schwerpunkt dieser Arbeit bildeten die Untersuchungen der Hypoxie-induzierten-Faktoren (HIF) hinsichtlich des Einflusses auf Proliferation, Migration und Transdifferenzierung pulmonalarterieller Fibroblasten (PA-FB) unter Hypoxie.

Ein zentraler Stimulus für die Umbauprozesse PA-FB ist die Hypoxie. Sie führt zu Änderungen der Proliferation, Migration und Transdifferenzierung der adventitiellen Zellen. Die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) sind entscheidende Transkriptionsfaktoren in der Antwort auf Hypoxie. Sie steuern über die Aktivierung ihrer Zielgene die zelluläre Reaktion. Ausgangspunkt der Arbeit war die Beobachtung, dass PA-FB im Vergleich zu den glatten Muskelzellen der Pulmonalarterie (PA-SMC) unter Hypoxie vermehrt proliferieren. Basierend auf der Hypothese dass die verschiedenen HIF Isoformen (HIF-1 α und HIF-2 α) unterschiedlichen Einfluss auf das physiologische Verhalten der PA-FB unter Hypoxie und damit im vaskulären Remodelling nehmen wurden beide Isoformen spezifisch inhibiert.

Die Etablierung der RNA Interferenz Methode zur gezielten Inhibition von Genen wurde an einer Modellzelllinie durchgeführt. Die hierbei gewonnen Erkenntnisse wurden auf die primären humanen pulmonalarteriellen Fibroblasten (PA-FB) übertragen. Im ersten Schritt wurde die Reaktion PA-FB unter Hypoxie bezüglich Proliferation, Apoptose, Migration und Transdifferenzierung untersucht. Im Anschluss untersuchten wir die Expression von HIF-1 α und HIF-2 α in Normoxie und Hypoxie auf mRNA und Proteinebene. Die Verknüpfung dieser beiden Schritte erfolgte über die Analyse der HIF Abhängigkeit der zellulären Reaktion PA-FB auf Hypoxie. Dabei wurde mittels siRNA zwischen den beiden Isoformen spezifisch differenziert. Der Ablauf der Experimente wurde nach dem in Abbildung 8 dargestellten Flussdiagramm durchgeführt.

Ziel der durchgeführten Untersuchungen war es die unterschiedliche Rolle der HIF Isoformen im Hypoxie-induzierten vaskulären Remodelling pulmonalarterieller Fibroblasten zu charakterisieren.

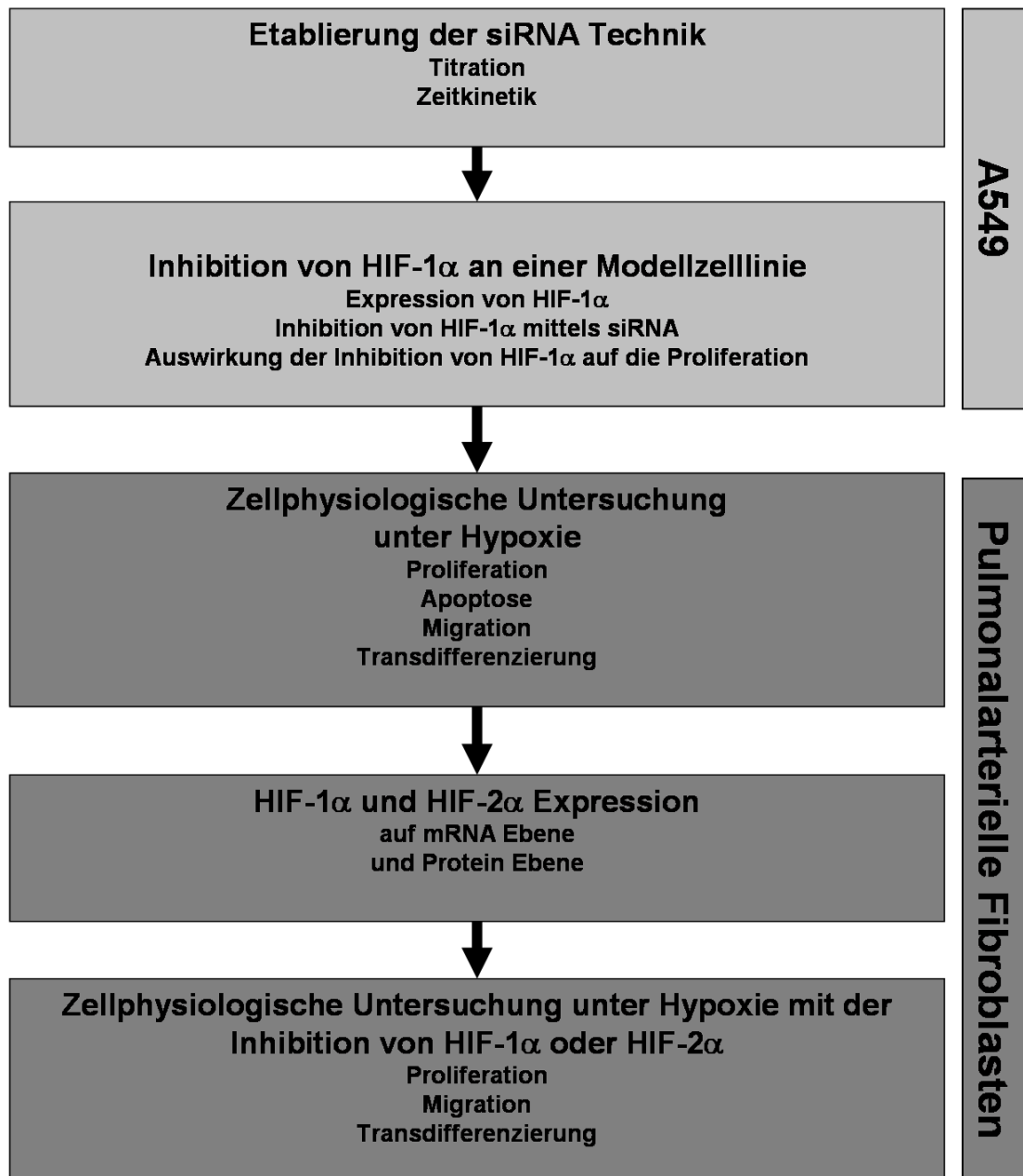


Abbildung 8: Flussdiagramm der durchgeführten Untersuchungen.

4.2 Etablierung der siRNA Technik an A549 Zellen

4.2.1 Anwendung von siRNA gerichtet gegen Luciferase an Luciferase exprimierenden A549 Zellen

Zur Etablierung von siRNA Anwendungen wurde zunächst die Adenokarzinomzelllinie A549 mittels eines Luciferase Plasmides stabil transfiziert. Das Luciferase Signal wurde durch Immunzytofluoreszenz in den A549 Zellen nachgewiesen (Abbildung 9, A). Der dafür verwendete Luciferase Antikörper zeigte in den Kontrollzellen (stabil exprimierender Kontrollvektor; PMG) kein Signal, während die A549-Luciferase-Zellen hauptsächlich positiv waren. Die A549-Luciferase Zellen wurden dann transient mit „small interfering RNA“ (siRNA) transfiziert und analysiert. Es wurde eine siRNA gegen Luciferase verwendet, die bereits in der Literatur beschrieben war (Elbashir et al., 2001). Zuerst wurde eine Titration verschiedener siRNA Konzentrationen durchgeführt (Abbildung 9 B). In den verwendeten Konzentrationen von 10 nM bis 100 nM konnte jeweils eine suffiziente Inhibition im Vergleich zu der Kontroll-siRNA (randomisierte Sequenz) nachgewiesen werden. Für weitere Experimente wurde ein Konzentrationsbereich von 20 bis 40 nM festgelegt, wie in der Literatur bereits beschrieben (Elbashir et al., 2001). Die folgende Zeitkinetik (Abbildung 9 C) wurde nach der Inkubationszeit der Transfektionskomplexe begonnen. Die Messung des Luciferase Signals ergab eine konstante Zunahme unter der siRNA-Kontrolle, dem normalen Wachstumsverhalten der Zellen entsprechend. Mit der siRNA-Luciferase konnte schon nach 8 Stunden eine Reduktion des Signals beobachtet werden. Bis zum letzten untersuchten Zeitpunkt von 120 Stunden konnte eine Inhibition mittels siRNA nachgewiesen werden.

4.3 Inhibition von HIF-1 α an A549 Zellen

4.3.1 Nachweis der Inhibition von HIF-1 α

Die zuvor ermittelten Daten konnten in den folgenden Experimenten für die Inhibition von HIF-1 α genutzt werden. Das Potential der Inhibition wurde zunächst mittels *real-time* PCR für HIF-1 α untersucht. Es zeigte sich eine circa 60%ige Reduktion der HIF-1 α mRNA unter siHIF-1 α im Vergleich zur si-Kontrolle (Abb. 10). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Normoxie und Hypoxie in der Kontrollgruppe festgestellt werden.

Der Nachweis von HIF-1 α mittels Immunzytofluoreszenz ergab ein nicht detektierbares Signal unter Normoxie, während unter Hypoxie die Zellkerne Signal positiv wurden (Abb. 11). Die Inhibition durch siHIF-1 α war nur unter hypoxischen Bedingungen nachweisbar. Die gleichzeitige Überexpression von HIF-1 α und Transfektion von siRNA ergab in der si-Kontroll-Gruppe eine weitere Zunahme der Signalintensität in Hypoxie. In Normoxie blieb

auch mit Überexpression das Signal undetektierbar, was auf eine Kompensation durch die Degradationsmechanismen für HIF-1 α hindeutet. Die gleichzeitige Transfektion von siHIF-1 α mit HIF-1 α -cDNA konnte auch die Überexpression verhindern (Abb. 11). Dieses Ergebnis wurde mit dem Western Blot für HIF-1 α bestätigt. Auch hier zeigte die siHIF-1 α eine suffiziente Inhibition. Im Anschluss erfolgte die Darstellung der Zeitkinetik der Inhibition von HIF-1 α . Dazu wurden die Zellen nach der Transfektion mit siRNA unter hypoxischen Bedingungen kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten (10, 24, 48 und 72 Stunden) für den HIF-1 α Western Blot gestoppt. Wie bereits in der Literatur beschrieben zeigte sich das stärkste HIF-1 α Signal (Abb. 12, si-random) zu einem frühen Zeitpunkt (hier 10 Stunden), während zu späteren Zeitpunkten das Signal auch ohne inhibitorische siRNA reduziert war. Die Inhibition mittels siHIF-1 α konnte schon nach 10 Stunden nachgewiesen werden und blieb über die untersuchten Zeiträume konstant.

Weiterhin wurden die Konsequenzen der Inhibition auf die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 α mittels einem Reporter-Plasmid-Konstrukt mit dem Hypoxie-responsiven-Element (HRE), der Bindungsstelle für HIF- α , untersucht. Die Transfektion des HRE-Luciferase-Reporter-Plasmids ergab einen Signalanstieg unter Hypoxie (Abb. 13, A), genau wie mit Kotransfektion von si-random. Als Kontrolle der siRNA Transfektion wurde die si-Luciferase (si-luc) verwendet, welche gegen das Reporter Protein (Luciferase) gerichtet ist. Die Kotransfektion von dem HRE-Luciferase-Reporter mit si-luc ergab eine Reduktion des Signals auf Basalwerte. Der Anstieg unter Hypoxie konnte durch siHIF-1 α unterbunden werden. Der Rückgang der transkriptionellen Aktivität wurde folgend auf HIF-1 α Zielgen - Ebene untersucht. Die mRNA Expression des *Vascular-Endothelial-Growth-Factors* (VEGF), der *Phosphoglyceratkinase* (PGK) und der *Häm-Oxygenase-1* (HO-1) als typische HIF-1 α Zielgene wurde unter dem Einfluss der siRNA Transfektion analysiert. Alle Zielgene zeigten einen starken Anstieg unter Hypoxie in der si-Kontrolle (si-random). Dieser Anstieg war durch die Inhibition von Hif-1 α nur noch schwach nachweisbar (Abb. 13, B).

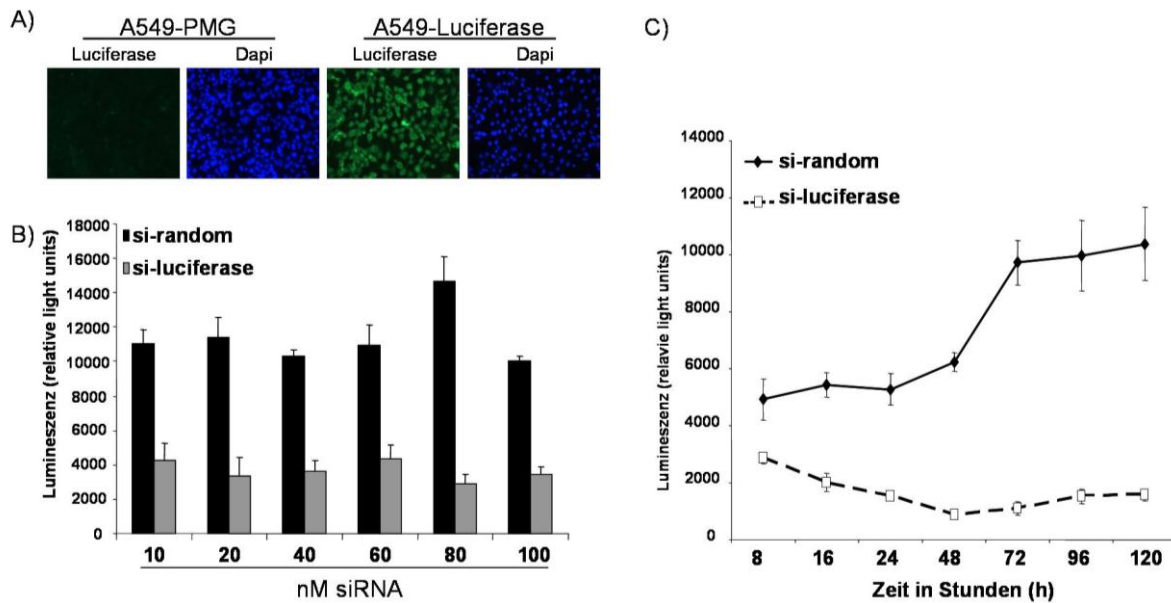


Abbildung 9: Inhibition des Luciferase Proteins mittels siRNA gegen Luciferase mit Titration und Analyse der Zeitkinetik.

A) Zur Charakterisierung der stabil transfizierten Zellen wurde mit einem Luciferase Antikörper in einer Immunzytofluoreszenz das exprimierte Luciferase Protein gefärbt. Die mit einem Kontrollplasmid stabil transfizierten Zellen (PMG) zeigten kein positives Signal, während bei den Luciferase-Zellen alle Zellen positiv waren. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen. (aufgenommen mit 200fach Objektiv). B) A549-Luciferase Zellen wurden mittels Lipofectamine 2000 transient mit siRNA-Luciferase (si-luciferase) und siRNA-Kontrolle (si-random) in verschiedenen Konzentrationen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen gestoppt und die Lumineszenz gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n = 5$ Versuchsansätzen. C) Nach 6 stündiger Inkubation der Transfektionskomplexe mit 40 nM siRNA wurden die Zellen gewaschen und im Serum - reduzierten Medium weiter kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen jeweils gestoppt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n = 4$ Versuchsansätzen.

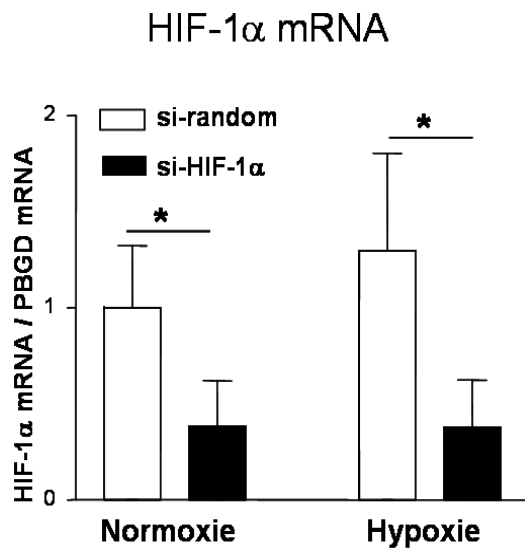


Abbildung 10: Nachweis der HIF-1 α Inhibition auf mRNA Ebene

Nach transienter Transfektion mit si-HIF-1 α oder si-Kontrolle wurden die Zellen für 24 Stunden in Normoxie oder Hypoxie kultiviert. Im Anschluss wurde die RNA isoliert und eine real time PCR für HIF-1 α durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der HIF-1 α mRNA relative zur PBGD mRNA. Es wurden $n = 5$ Versuchsansätze durchgeführt; (* = $P < 0,05$).

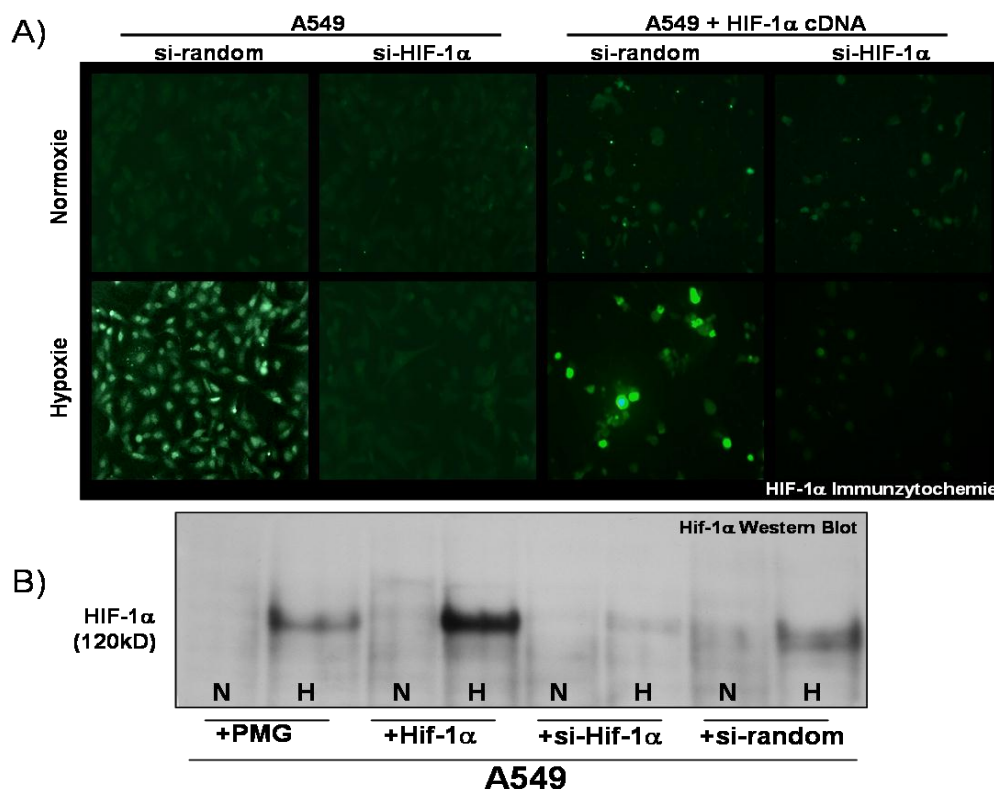


Abbildung 11: Nachweis der HIF-1 α Inhibition auf Protein Ebene

A, B Nach transienter Transfektion mit si-HIF-1 α , si-Kontrolle, PMG oder HIF-1 α wurden die Zellen für 24 Stunden in Normoxie (N) oder Hypoxie (H) gestellt. Danach wurde die Immunzytofluoreszenz (A) bzw. der Western Blot (B) für HIF-1 α durchgeführt. A) Dargestellt sind repräsentative Bilder aus $n = 5$ Versuchsansätze (aufgenommen mit 200x Objektiv). B) Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus $n = 3$ Wiederholungen.

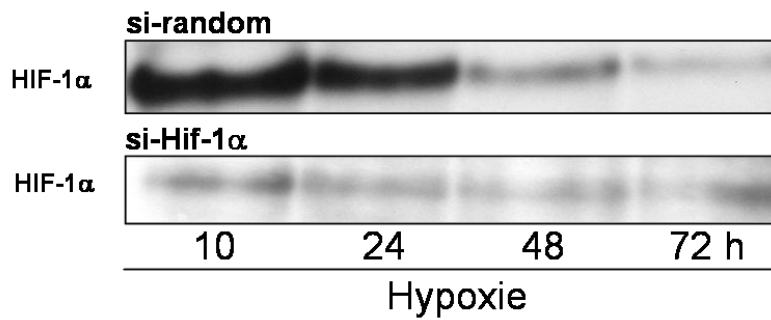


Abbildung 12: Zeitkinetik der HIF-1 α Inhibition

Nach Transfektion von si-random als Kontrolle oder siHIF-1 α wurden die Zellen für 10, 24, 48 oder 72 Stunden

unter hypoxischen Bedingungen kultiviert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen für den HIF-1 α Western Blot gestoppt. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus $n = 3$ Wiederholungen.

4.3.2 Auswirkungen der Inhibition von HIF-1 α auf die Proliferation von A549 Zellen unter Hypoxie

Im ersten Schritt wurden die nativen Zellen analysiert. Es zeigte sich, dass Hypoxie eine Verschiebung im Zellzyklus zugunsten der G0/G1 Phase bedingt. Nach vorheriger Synchronisation befanden sich nach 24 Stunden 55,1% der normoxischen Zellen in der G0/G1 Phase, während es unter Hypoxie 63,1% waren. Die prozentuale Zunahme der G0/G1 Phase ging zu Lasten der S/G2 Phase mit einem Anteil von 44,9% der Zellen unter Normoxie und 36,9% unter Hypoxie (Abb. 14, A). Das gleiche Ergebnis wurde auch mit dem BrdU-Assay ermittelt. Hier wurden die Zellen für 24 Stunden in Normoxie bzw. Hypoxie mit 0%, 0,1% oder 0,5% fötalem Kälberserum (FKS) inkubiert (Abb. 14, B). Die Zugabe des FKS als Wachstumsstimulation bewirkte eine kontinuierliche Zunahme der S-Phase in Normoxie. Hypoxische Zellen hingegen zeigten wieder einen Rückgang der S-Phase, auch mit der Zugabe von FKS. Im zweiten Schritt wurde die Rolle von HIF-1 α in dem Hypoxie-induzierten Zellzyklus-Arrest untersucht. Die Zellzyklus-Analyse mit der Inhibition von HIF-1 α ergab unter hypoxischen Bedingungen einen Rückgang der in der G0/G1 Phase befindlichen Zellen von 72,3% ($\pm 1.9\%$) in der Kontrollgruppe, auf 64,3% ($\pm 2.4\%$) in der siHIF-1 α behandelten Gruppe (Abb. 15, A). Gleichzeitig nahm der prozentuale Anteil der Zellen in der S/G2 Phase in Hypoxie von 27,7% ($\pm 3,5\%$) in der Kontrollgruppe (si-random) auf 35,7% ($\pm 2,4\%$) in der siHIF-1 α Gruppe zu (Abb. 15, A). Dieses Ergebnis wurde durch die S-Phasen Bestimmung mit Hilfe des BrdU-Assays bestätigt (Abb. 15, B). Auch hier ging die S-Phase unter Hypoxie in der si-Kontrolle zurück, während siHIF-1 α eine Zunahme der S-Phase bewirkte.

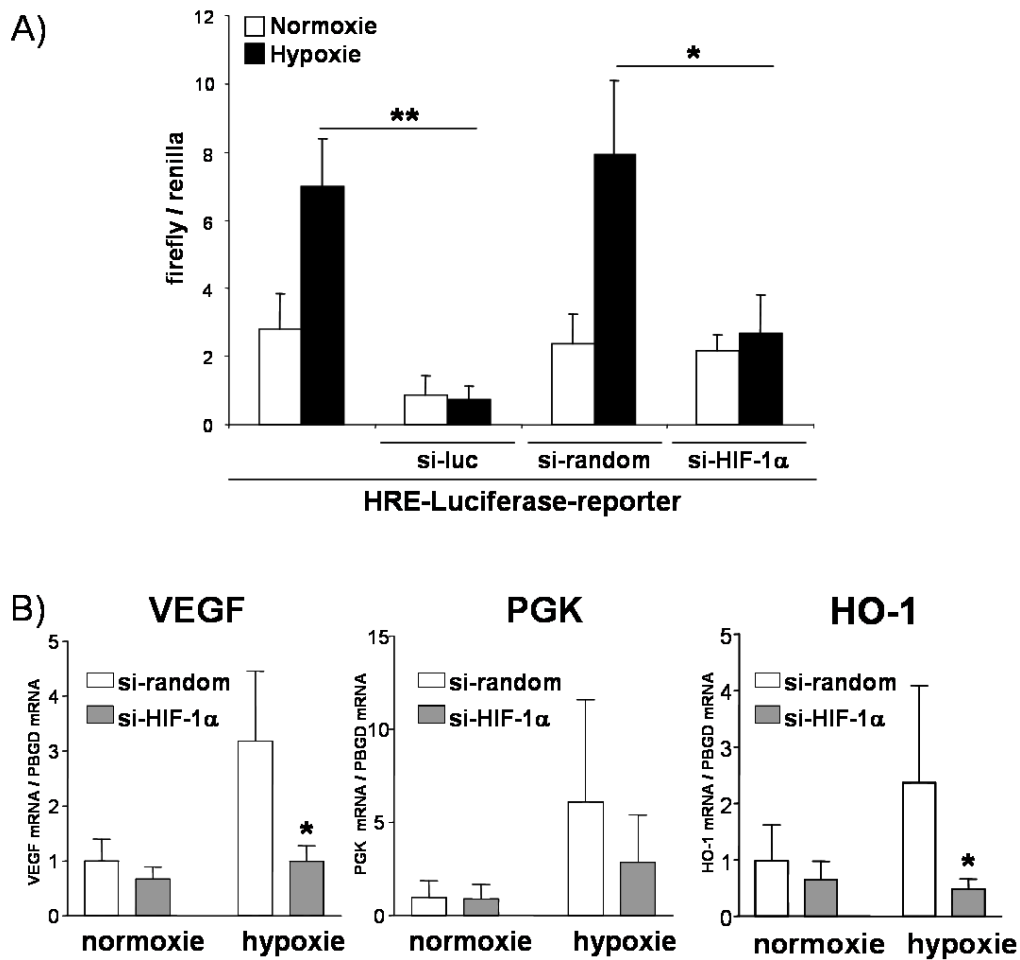


Abbildung 13: Die Inhibition von HIF-1 α verhindert die transkriptionelle Aktivierung und damit die Expression HIF-1 α abhängiger Zielgene

A) Acht Stunden nach der gemeinsamen Transfektion von HRE-Luciferase, Renilla Kontrollplasmid mit der jeweiligen siRNA wurden die Zellen für 24 Stunden in Normoxie oder Hypoxie gestellt. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und die Lumineszenz unter Substratzugabe ermittelt (siehe Material und Methoden). Die Daten sind dargestellt als die Mittelwerte \pm Standardabweichung des Quotienten von Luciferase (firefly) durch Renilla-Kontrolle. Es wurden $n = 5$ Versuchsansätze durchgeführt; (* = $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). B) Acht Stunden nach der Transfektion von si-random oder siHIF-1 α wurden die Zellen für 24 Stunden in Normoxie oder Hypoxie kultiviert und danach für die PCR vorbereitet. Die PCR wurde für den Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF), die Phosphoglyceratkinase (PGK), und für die Häm-Oxygenase-1 (HO-1) durchgeführt. Die Daten sind dargestellt als die Mittelwerte \pm Standardabweichung des Quotienten aus Zielgen mRNA relative zu PBGD mRNA. Es wurden $n = 4$ Versuchsansätze durchgeführt; (* = $P < 0,05$).

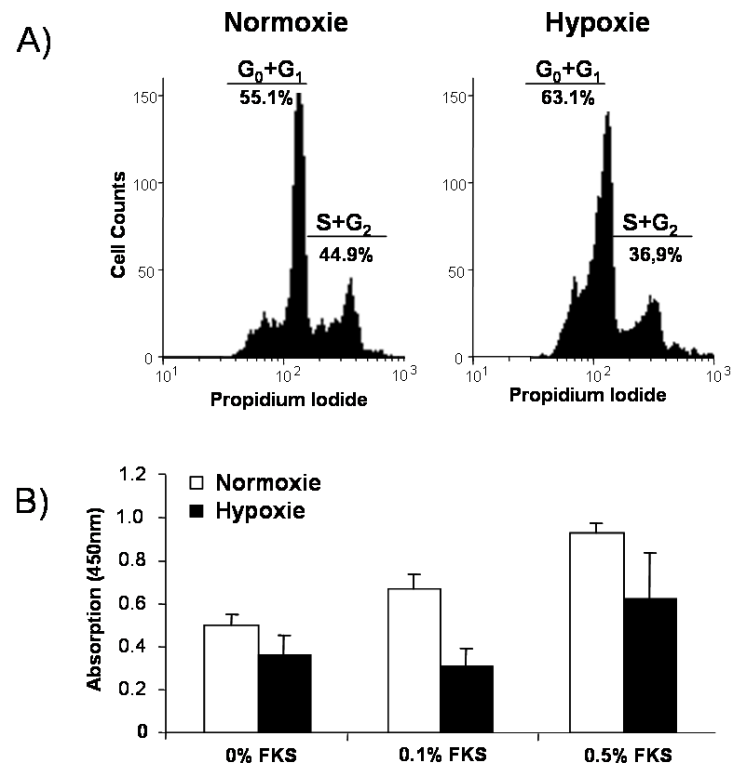


Abbildung 14: Auswirkung von Hypoxie auf die Proliferation von A549 Zellen.

A) Nach 24 stündiger Synchronisation durch Serumentzug wurden die Zellen für weitere 24 Stunden ohne Serum in Normoxie und Hypoxie kultiviert. Nach Propidium Iodide Färbung wurden der prozentuale Anteil der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase über den DNA Gehalt im FACS gemessen. Die Bilder sind repräsentativ aus $n = 5$ Versuchansätzen. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte. B) Für das BrdU Assay wurden die Zellen wie unter A) beschrieben synchronisiert und mit 0%, 0.1% bzw. 0.5% fötalem Kälber Serum (FKS) für 24 Stunden unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert. Die Daten sind dargestellt als die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n = 3$ Versuchansätzen.

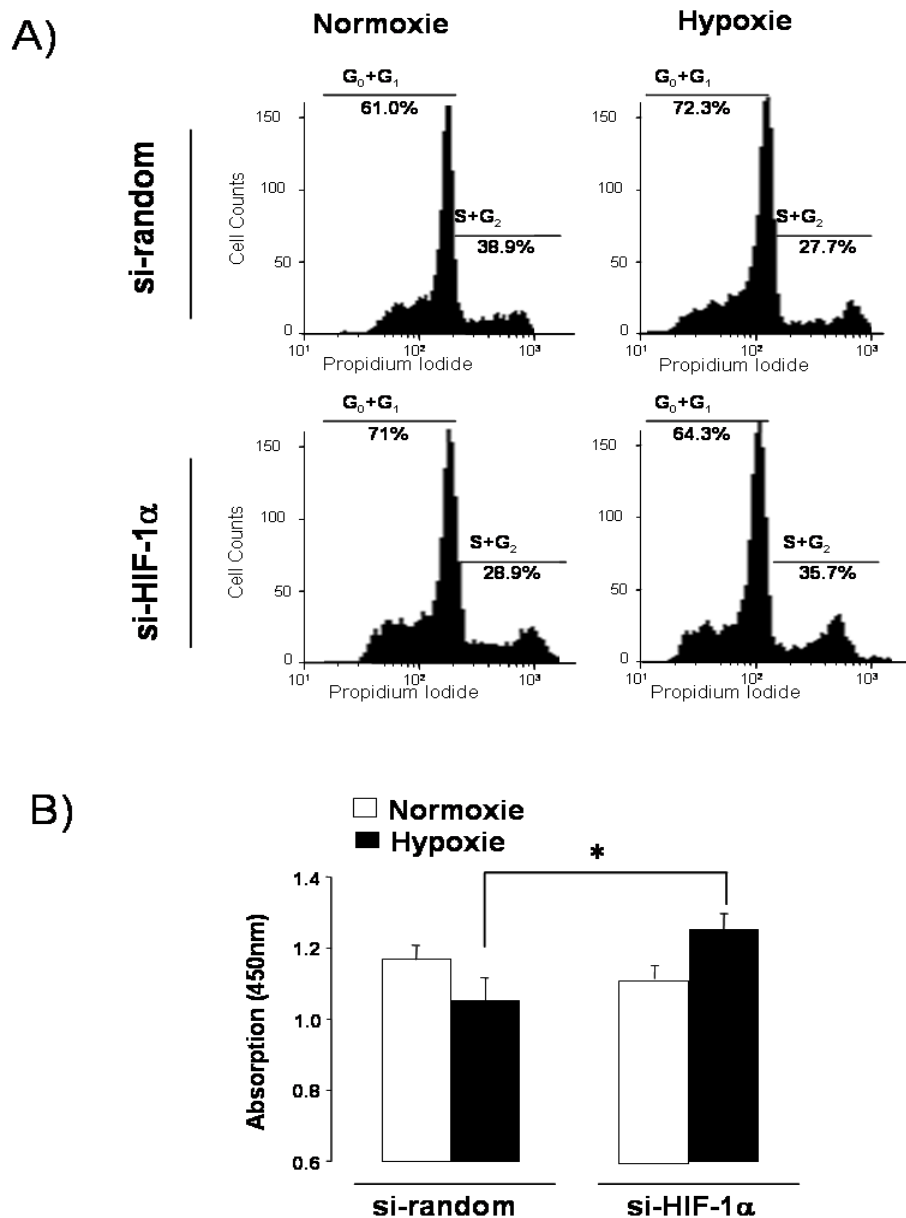


Abbildung 15: Änderung in der Zellzyklusphase durch die Inhibition von HIF-1 α

A) Nach der Inkubationszeit der Transfektion mit si-random (Kontrolle) oder siHIF-1 α wurden die Zellen für 24 Stunden synchronisiert. Im Anschluss folgten weitere 24 Stunden ohne Serum in Normoxie und Hypoxie. Nach Propidiumjodid Färbung wurden der prozentuale Anteil der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase über den DNA Gehalt im FACS gemessen. Die Bilder sind repräsentativ aus $n = 4$ Versuchansätzen. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte. B) Für das BrdU Assay wurden die Zellen wie unter A) beschrieben transfiziert und synchronisiert. Nach 24 stündiger Inkubation in Normoxie oder Hypoxie wurde der Versuch gestoppt. Die Daten sind dargestellt als die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n = 5$ Versuchansätzen (*, $P < 0,05$).

G0/G1 Phase					
Normoxie			Hypoxie		
A549	si-control	si-Hif-1 α	A549	si-control	si-Hif-1 α
55,1 \pm 1,3	61,0 \pm 1,9	71,0 \pm 2,7	63,1 \pm 2,7	72,3 \pm 3,5	64,3 \pm 2,4
S/G2 Phase					
Normoxie			Hypoxie		
A549	si-control	si-Hif-1 α	A549	si-control	si-Hif-1 α
44,9 \pm 1,3	39,0 \pm 1,9	29,0 \pm 2,7	36,9 \pm 2,7	27,7 \pm 3,5	35,7 \pm 2,4

Abbildung 16: Mittelwerte der Zellzyklusanalyse von A549 Zellen mit und ohne Transfektion mit siRNA.

Tabellarische Darstellung der Zellzyklusanalyse aus den Abbildungen 14 und 15. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n = 5$ Versuchen für native A549 Zellen und $n = 4$ für transfizierte Zellen.

4.4 Die Rolle der Hypoxie-induzierbaren Faktoren in pulmonalerteriellen Fibroblasten

4.4.1 Physiologische Reaktion pulmonalerterieller Fibroblasten auf Hypoxie

Das vaskuläre Remodelling der pulmonalen Hypertonie beruht auf vielfältigen zellulären Reaktionen und Interaktionen. Zur Untersuchung der Hypothese, dass die Hypoxie-induzierten Faktoren in pulmonalerteriellen Fibroblasten eine entscheidende Rolle in der zellulären Reaktion auf Hypoxie spielen, analysierten wir zunächst die nativen PA-FB bezüglich Proliferation, Apoptose, Migration und Transdifferenzierung. Hypoxie führte in den PA-FB zu einer Verdopplung der Zellzahl (Abb. 17, A), bedingt durch eine Verschiebung im Zellzyklus zugunsten der S-Phase (Abb. 17, B). Die Zunahme der S-Phase führte gleichzeitig zu einem Rückgang der Zellen in der G0/G1 Phase. Dieses Ergebnis wurde mit Hilfe des BrdU Assay bestätigt. Sowohl Hypoxie, wie auch die Zugabe von fötalem Kälberserum (FKS) als Positiv-Kontrolle, führte zu einer Zunahme der Zellen in der S-Phase (Abb. 17, C). Die Ermittlung der apoptotischen PA-FB ergab einen Rückgang von 10% unter hypoxischen Bedingungen, was die Dominanz der Änderungen im proliferativen Verhalten unterstreicht (Abb. 18). Im nächsten Schritt untersuchten wir die Auswirkungen von Hypoxie auf die Migration von PA-FB. Als Positiv-Kontrolle wurde Angiotensin II, ein zuvor beschriebener Stimulus für die Migration von PA-FB (Krick et al., 2005), benutzt. Sowohl Angiotensin II, wie auch Hypoxie induzierten die Migration der Zellen unter Hypoxie (Abb. 19). Nachdem Hypoxie die Proliferation und die Migration PA-FB induzierte, untersuchten wir mit Hilfe

einer alpha-Smooth-Muscle-Cell-Aktin Färbung (α -SMA), die Fähigkeit der Zellen sich in Myofibroblasten zu differenzieren. Als Kontrollgruppe dienten pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (PA-SMC), die im α -SMA-Western Blot eine starke Bande boten (Abb. 20, A). Im Gegensatz dazu erreichten die PA-FB ein deutlich schwächeres Signal. Da ein möglicher Zusammenhang zwischen der Transdifferenzierung und der proliferativen Aktivität besteht untersuchten wir die Expression von α -SMA mit 50% und 90% konfluenten Zellen. In Abb. 20, B wird deutlich, dass die 50% konfluenten Zellen in der Lage waren zu proliferieren, während die S-Phase der 90% konfluenten Gruppe deutlich reduziert war. Die humanen PA-FB zeigten weder in der proliferierenden noch in der nicht proliferierenden Gruppe ein α -SMA Anstieg unter Hypoxie. Um die Exposition der Zellen in Normoxie und Hypoxie innerhalb dieses Experiments zu belegen erfolgte ein HIF-1 α Western Blot aus den zuvor verwendeten Extrakten (Abb. 20, C). Ein deutlicher Anstieg für HIF-1 α konnte unter Hypoxie nachgewiesen werden, während in Normoxie das Signal nicht detektierbar war. Um den physiologischen Phänotyp der primären humanen PA-FB zu erhalten, wurden diese bis maximal zur sechsten Passage verwendet. Das Potential der PA-FB sich in Myofibroblasten zu differenzieren wurde im nächsten Schritt untersucht. Dazu wurde TGF- β , ein bekannter Stimulus für Fibroblasten zur Transdifferenzierung in Myofibroblasten, verwendet. Wir inkubierten daher die Zellen mit TGF- β oder DMSO als Kontrolle. Es zeigte sich ein starker Anstieg der α -SMA Expression unter TGF- β im Vergleich zur Kontrolle, während die PA-SMC als Positiv-Kontrolle das stärkste Signal zeigten (Abb. 21).

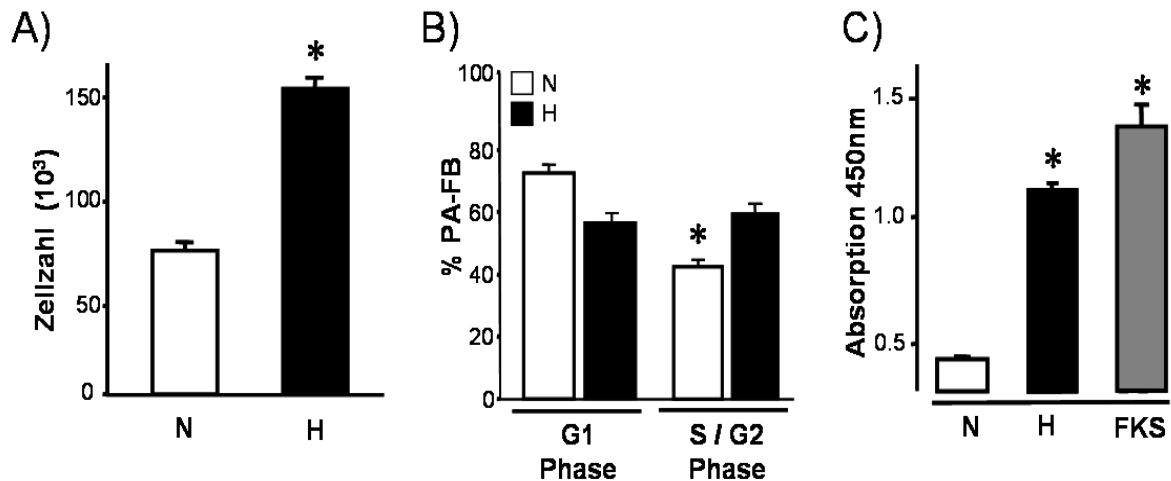


Abbildung 17: Proliferation PA-FB unter Hypoxie.

A) Es wurden 50.000 Zellen pro well auf 6 well Platten ausgesät und nach einer Adhärenz- und Synchronisationsphase für weitere 24 Stunden in Normoxie und Hypoxie gestellt. Im Anschluss wurden die Zellen trypsinisiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer ermittelt. Die Daten sind dargestellt als die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n = 5$ Versuchansätzen (*, $P < 0,05$). B) Für die Zellzyklusanalyse wurden die Zellen wie unter A) beschrieben behandelt. Nach Propidiumjodid Färbung wurden der prozentuale Anteil der Zellen in der jeweiligen Phase des Zellzyklus über den DNA Gehalt im FACS gemessen. Die Daten sind dargestellt als die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n = 3$ Versuchansätzen (*, $P < 0,05$). C) Für die BrdU Assay wurden die Zellen wie unter A) beschrieben behandelt. Nach 24 Stunden Normoxie oder Hypoxie wurde der Versuch gestoppt. Die Daten sind dargestellt als die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n = 5$ Versuchansätzen (*, $P < 0,05$).

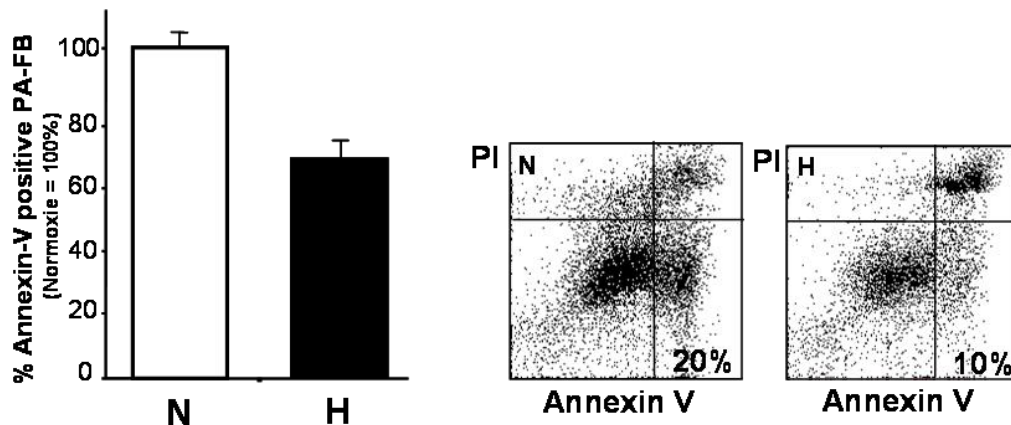


Abbildung 18: Hypoxie führt zu einer Reduktion der Apoptose in PA-FB.

Nach 24 stündiger Exposition der Zellen in Normoxie oder Hypoxie wurden die Zellen trypsinisiert und der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen wurde mittels Annexin V Bindung im FACS ermittelt. Nekrotische Zellen wurden mit der Propidiumjodid (PI) Gegenfärbung ausgeschlossen. Im linken Teil der Abbildung sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n = 5$ Versuchansätzen dargestellt. Die normoxische Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Im rechten Teil ist ein repräsentatives Bild aus den 5 Versuchen dargestellt.

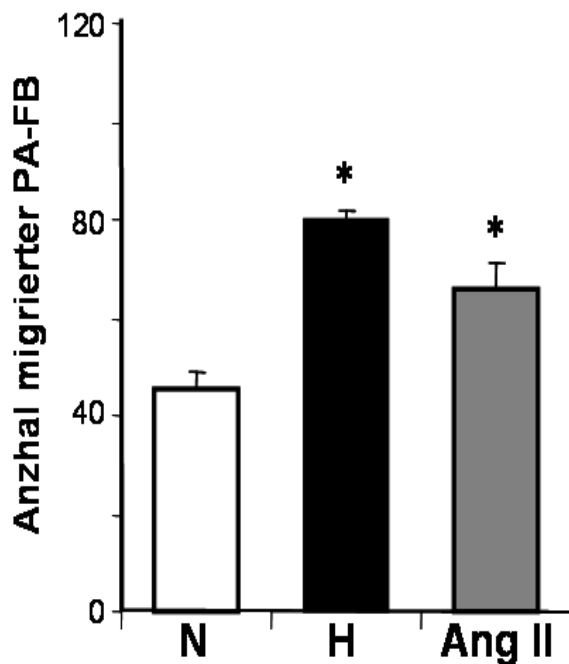


Abbildung 19: : Migration PA-FB unter Hypoxie.

Zur Untersuchung der Migration wurden 2000 PA-FB in den oberen Teil der modifizierten Boyden-Kammer pipettiert. Im unteren Teil wurde normales Wachstumsmedium platziert. Als Positiv-Kontrolle wurde dem Medium Angiotensin II (Ang II) zugesetzt. Die Zellen wurden für 24 Stunden unter Normoxie (N) oder Hypoxie (H) kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen der oberen Hälfte entfernt und die Zellen, die auf die Unterseite migriert sind mit Kristall-Violett gefärbt.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n = 5$ Versuchansätzen (* = $P < 0,05$).

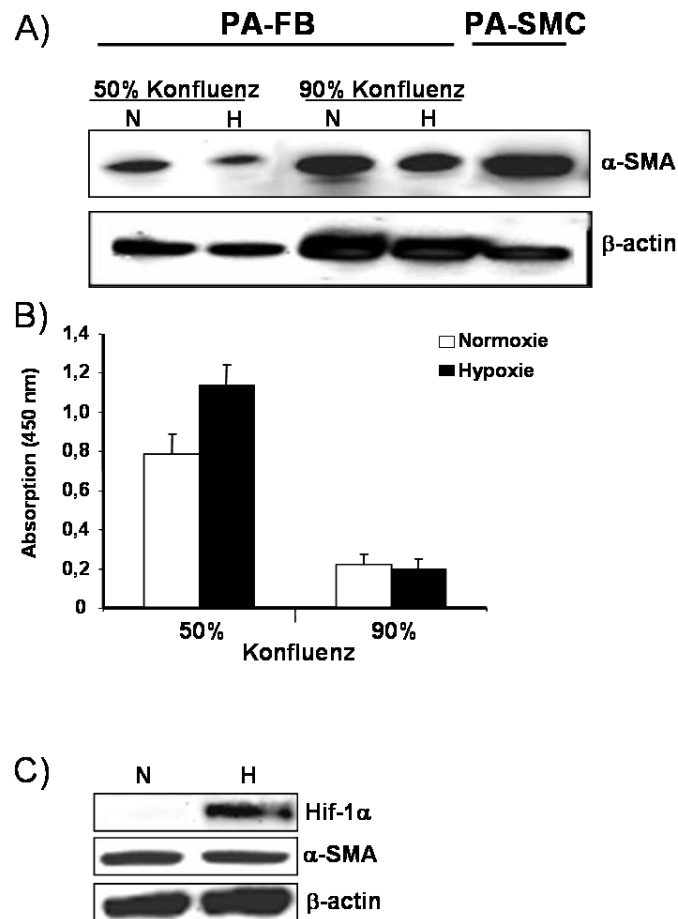


Abbildung 20: Transdifferenzierung der PA-FB unter Hypoxie.

A) PA-FB wurden mit 50 und 90%iger Konfluenz ausgesät und nach einer 24 stündigen Adhärenzphase für 72 Stunden unter Normoxie (N) oder Hypoxie (H) kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen zur Proteinanalytik gestoppt. Als Positivkontrolle wurden pulmonalarterielle-glatte-Muskelzellen (PA-SMC) verwendet. Analysiert wurde die Expression von alpha-Smooth-Muscle-Cell-Aktin (α -SMA) und β -Aktin als Kontrolle. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus $n = 3$ Wiederholungen. B) Mit dem Versuchsprotokoll von A) wurde an den PA-FB gleichzeitig ein BrdU-Assay durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n = 3$ Versuchansätzen. C) Aus den Proteinextrakten von A) wurde ein HIF-1 α Western Blot zur Kontrolle der Hypoxie durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot der 50% konfluenten Gruppe aus $n = 2$ Wiederholungen.

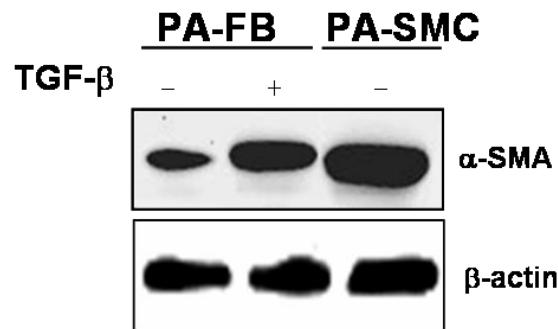


Abbildung 21: Induktion der Transdifferenzierung von PA- FB.

PA-FB wurden mit und ohne 10ng/ μ l TGF- β für 72 Stunden unter Normoxie kultiviert und im Anschluss wurden die Zellen zur Proteinanalytik gestoppt. Als Positivkontrolle wurden pulmonalarterielle-glatte-Muskelzellen (PA-SMC) verwendet. Analysiert wurde die Expression von alpha-Smooth-Muscle-Cell-Aktin (α SMA) und als Kontrolle β -Aktin. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus $n = 3$ Wiederholungen.

4.4.2 Expression von HIF-1 α und HIF-2 α in PA-FB

Zur Untersuchung der Reaktion pulmonalarterieller Fibroblasten auf Hypoxie in Abhängigkeit von den Hypoxie-induzierbaren Faktoren wurde zunächst die Expression beider HIF-Isoformen in den PA-FB dargestellt. In der Western Blot Analyse aus Gesamtzell-Lysaten zeigte sich, dass beide Isoformen unter hypoxischen Bedingungen vermehrt nachweisbar waren. Während HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen nicht darstellbar war, zeigte HIF-2 α jedoch eine deutliche Bande (Abb. 22, A). Weiterhin wurde eine Immunzytofluoreszenz für HIF-1 α und HIF-2 α durchgeführt, um die Lokalisation der HIF Expression zu ermitteln (Abb. 22, B). Wie auf den Bildern in Abb. 22 B ersichtlich, war die HIF-2 α Expression unter Normoxie hauptsächlich im Zytosol zu finden. In Hypoxie hingegen akkumuliert das HIF-2 α Signal dann im Zellkern. HIF-1 α war, wie auch im Western Blot, unter normoxischen Bedingungen nicht nachweisbar. Erst unter Hypoxie zeigte sich ein deutliches im Zellkern lokalisiertes Signal. Im nächsten Schritt wurden drei HIF Zielgene, *Phosphoglyceratkinase* (PGK), *Vascular-Endothelial-Growth-Factor* (VEGF) und *VEGF-Rezeptor-2* (VEGFR2 / KDR) analysiert, um die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 α und HIF-2 α darzustellen. Wie in Abb. 23 ersichtlich zeigten alle drei Zielgene einen Anstieg ihrer mRNA unter Hypoxie.

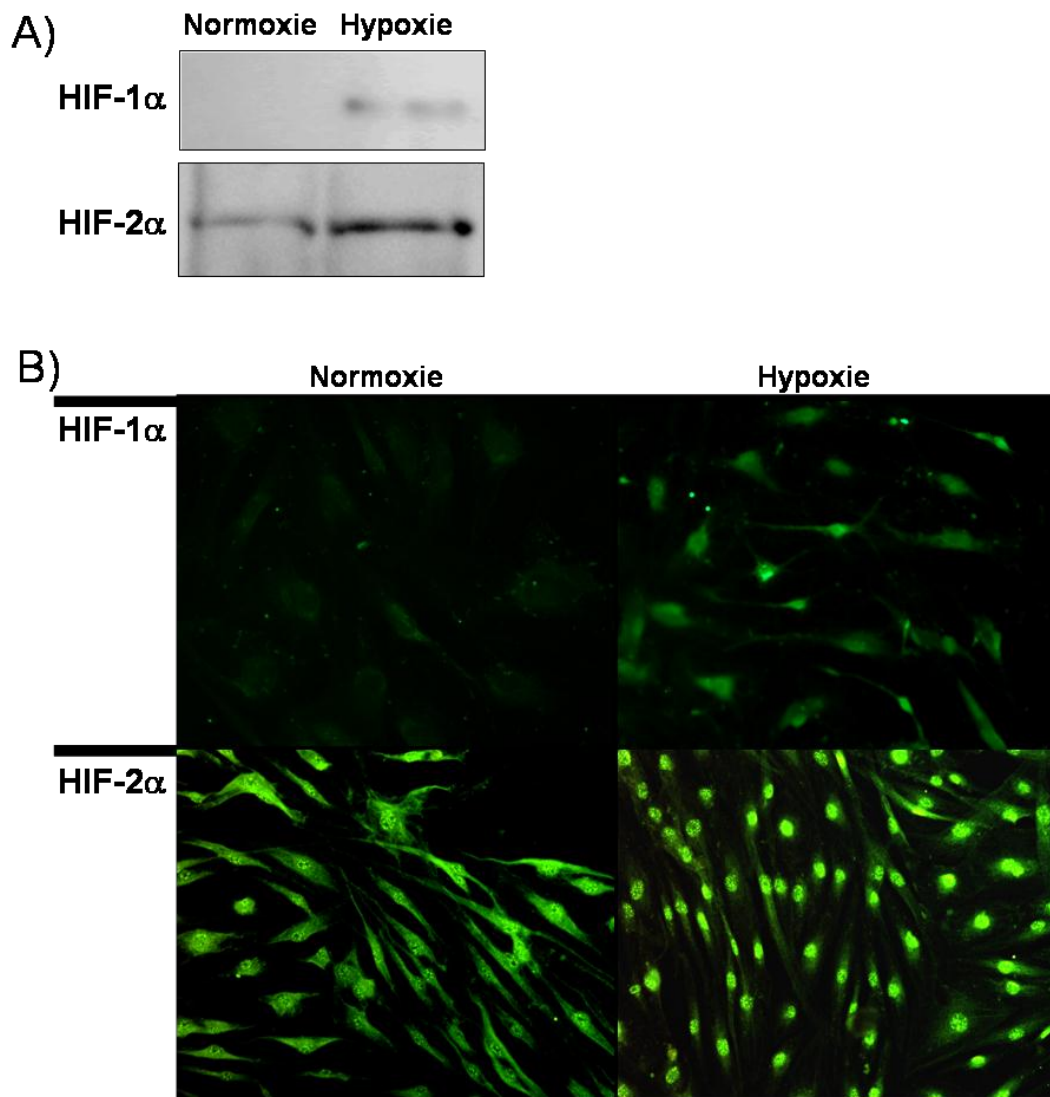


Abbildung 22: Expression von HIF-1 α und HIF-2 α auf Proteinebene in PA-FB.

Pulmonalarterielle Fibroblasten wurden für 24 Stunden in Normoxie oder Hypoxie kultiviert. Danach wurde der Western Blot (A) bzw. die Immunzytofluoreszenz (B) für HIF-1 α und HIF-2 α durchgeführt. Dargestellt in A) ist ein repräsentativer Western Blot aus $n = 3$ Versuchsansätzen. In B) sind repräsentative Bilder (mit 200x Objektiv aufgenommen), aus $n = 5$ Versuchsansätzen gezeigt.

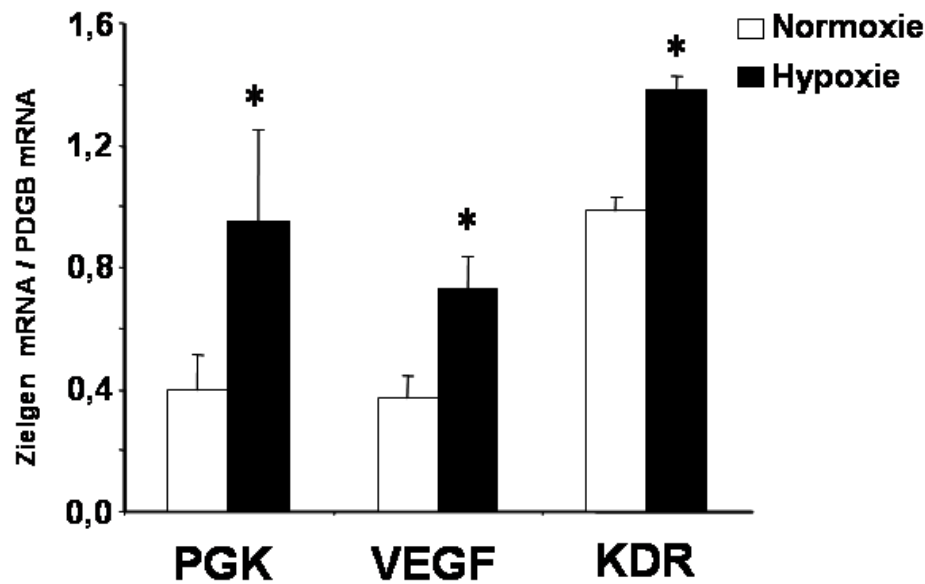


Abbildung 23: mRNA Expression von HIF Zielgenen in Normoxie und Hypoxie.

Nach 24 Stunden Normoxie bzw. Hypoxie wurden die PA-FB für die PCR gestoppt. Es wurde nach RNA Extraktion eine real time PCR für den Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF), die Phosphoglyceratkinase (PGK), und für den Vascular-Endothelial-Growth-Factor-Rezeptor-2 (VEGFR2 / KDR) durchgeführt. Die Daten sind dargestellt als die Mittelwerte \pm Standardabweichung des Quotienten aus Zielgen mRNA (VEGF, PGK, KDR) relative zu PBGD mRNA. Es wurden $n = 3$ Versuchsansätze durchgeführt (*, $P < 0,05$).

4.4.3 siRNA gegen HIF-1 α und HIF-2 α in PA-FB

Nach der Darstellung der Expression beider HIF Isoformen in PA-FB wurde im nächsten Schritt das siRNA Verfahren zur Gen-Inhibition von der Modellzelllinie A549 auf die primären Zellen übertragen. Die siRNA Sequenz für HIF-2 α wurde aus bereits publizierter Literatur entnommen (Sowter et al., 2003) und an den PA-FB angewendet. Die Effekte der Gen-Inhibition wurden zunächst auf mRNA Ebene dokumentiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit für die Transfektion von der siRNA-Kontrolle (si-random), siHIF-1 α oder siHIF-2 α wurden die Zellen für 24 Stunden in Normoxie oder Hypoxie gestellt und danach für die PCR vorbereitet. Die real time PCR wurde sowohl für die HIF-1 α mRNA, wie auch für die HIF-2 α mRNA durchgeführt. Wie bereits bei den A549 Zellen beschrieben zeigte sich in der Kontrollgruppe (si-random) keine signifikante Änderung der mRNA Quantität unter Hypoxie weder für HIF-1 α , noch für HIF-2 α (Abb. 24, A, B). Die Transfektion von siHIF-1 α reduzierte die HIF-1 α mRNA signifikant, während die siHIF-2 α Transfektion keinen Einfluss hatte (Abb. 24, A). Auch in der PCR für HIF-2 α konnte eine Inhibition nur unter der Einwirkung von siHIF-2 α dargestellt werden, während siHIF-1 α keine Auswirkungen auf die

HIF-2 α mRNA hatte (Abb. 24, B). Die Inhibition von HIF-1 α und HIF-2 α durch die jeweilige siRNA führte auch zu einer Reduktion der Proteinexpression, dargestellt in der Immunzytologie (Abb. 24, C). Der hypoxische Anstieg für HIF-1 α konnte durch siHIF-1 α unterbunden werden, während HIF-2 α in Normoxie und Hypoxie mit siHIF-2 α Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (si-random) nicht mehr darstellbar war.

Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen der Inhibition auf die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 α und HIF-2 α untersucht. Dazu wurde, wie oben an den nativen PA-FB bereits etabliert, die mRNA Analyse von drei HIF spezifischen Zielgenen durchgeführt. Die mRNA Level der *Phosphoglyceratkinase* (PGK) waren unter hypoxischen Bedingungen in der siRNA Kontrolle (si-random) erhöht (Abb. 25, A). Die Inhibition von HIF-1 α , wie auch von HIF-2 α reduzierte die PGK mRNA Level. Die Analyse der *Vascular-Endothelial-Growth-Factor* (VEGF) mRNA ergab auch eine Reduktion der VEGF mRNA durch siHIF-1 α , wie auch siHIF-2 α im Vergleich zur Kontrolle. Auch VEGF zeigte in der Kontrollgruppe eine starke Induktion unter Hypoxie (Abb. 25, B). Wie PGK und VEGF zeigte auch die Untersuchung des VEGF Rezeptors 2 (VEGFR2/KDR) eine Induktion der mRNA unter Hypoxie in der Kontrollgruppe. Die Inhibition von HIF-1 α hatte keinen Einfluss auf die VEGFR2/KDR mRNA, während die Behandlung mit siHIF-2 α zu einer Reduktion der VEGFR2/KDR mRNA führte (Abb. 25, C).

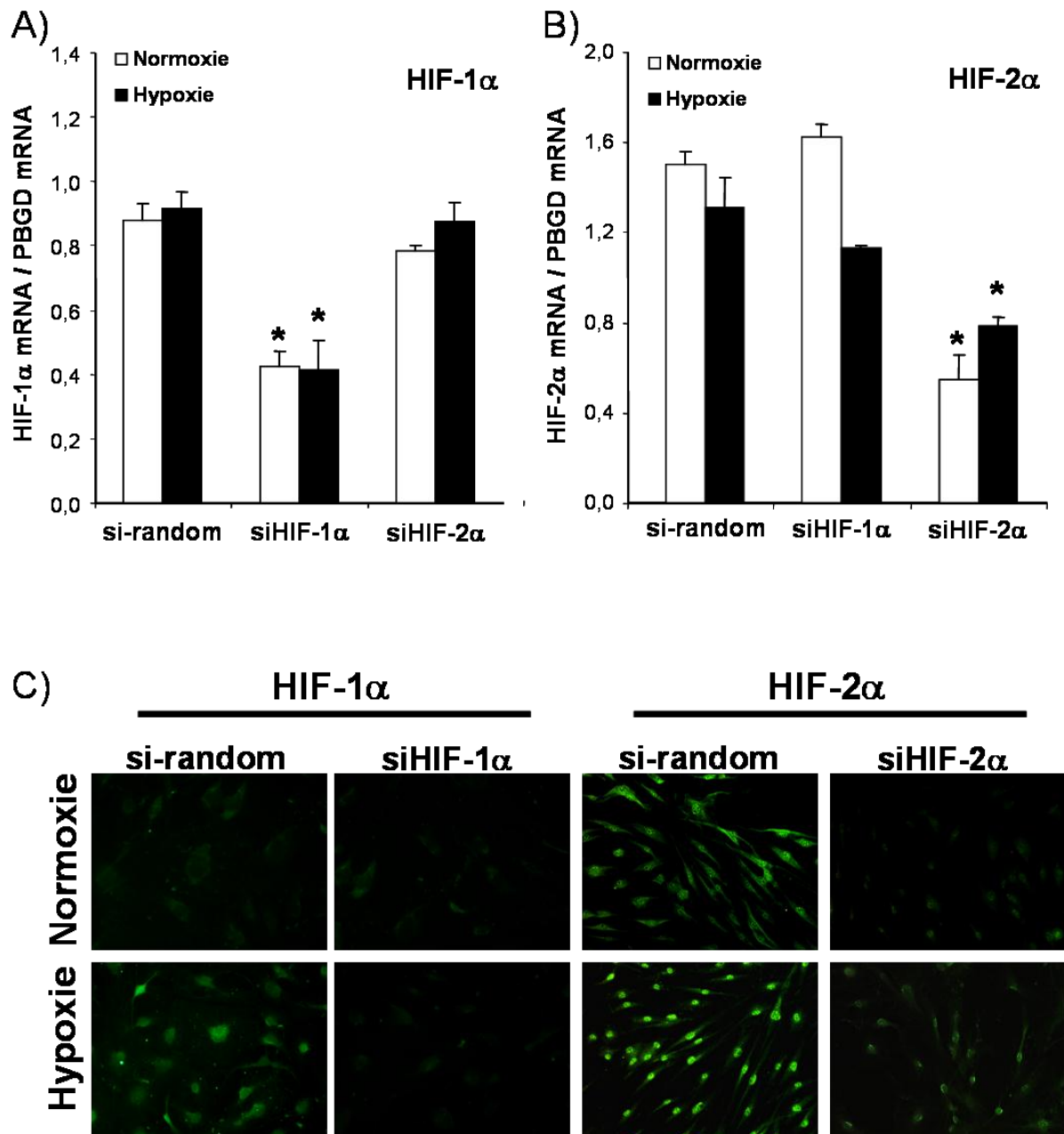


Abbildung 24: : Spezifische Inhibition von HIF-1α und HIF-2α in PA-FB auf mRNA- und Protein-Ebene.

Nach transienter Transfektion mit si-Kontrolle, si-HIF-1α oder siHIF-2α wurden die Zellen 24 Stunden Normoxie oder Hypoxie ausgesetzt. A,B) Im Anschluss wurden die Zellen für PCR gestoppt, und nach entsprechender Vorbereitung die real time PCR durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus $n = 5$ Experimenten \pm Standardabweichung (* = $P < 0,05$). C) Nach der Fixierung der PA-FB wurde die Immunzytofluoreszenz für HIF-1α und HIF-2α durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus $n = 3$ Versuchsansätzen, aufgenommen mit einem 200 fach Objektiv.

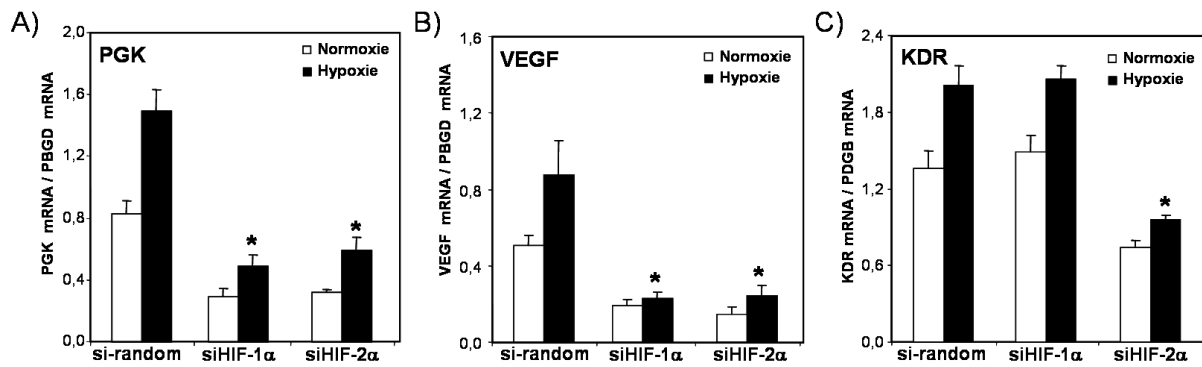


Abbildung 25: Inhibition der mRNA Expression von HIF Zielgenen durch siRNA.

A), B), C) Acht Stunden nach der Transfektion von si-random, siHIF-1α oder siHIF-2α wurden die Zellen für 24 Stunden in Normoxie oder Hypoxie kultiviert und danach für die PCR vorbereitet. Die PCR wurde für die Phosphoglyceratkinase (PGK), den vascular-endothelial-Growth-Factor (VEGF), und für den VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR2 / KDR) durchgeführt. Die Daten sind dargestellt als die Mittelwerte \pm Standardabweichung des Quotienten aus Zielgen mRNA (PGK, VEGF, KDR) relative zu PBGD mRNA. Es wurden $n = 4$ Versuchsansätze durchgeführt (* = $P < 0,05$).

4.4.4 Einfluss der Inhibition von HIF-1α und HIF-2α auf die Hypoxie induzierte physiologische Reaktion PA-FB

Im letzten Schritt wurde nun die Rolle der Hypoxie induzierbaren Faktoren in der physiologischen Reaktion pulmonalarterieller Fibroblasten auf Sauerstoffmangel analysiert. Dazu wurde der Einfluss der spezifischen Inhibition auf die Proliferation, Migration und Transdifferenzierung unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen analysiert. Wie in Abbildung 26 dargestellt, befanden sich die PA-FB der siRNA-Kontrollgruppe (si-random) unter Hypoxie vermehrt in der S-Phase. Dieses Ergebnis war analog zu den vorherigen Untersuchungen an den nativen PA-FB (siehe 4.4.1). Die Inhibition von HIF-1α hatte keinen signifikanten Einfluss auf das proliferative Verhalten der Zellen. Die Behandlung der PA-FB mit siHIF-2α hingegen resultierte in einem signifikanten Rückgang der S-Phase unter hypoxischen Bedingungen (Abb. 26). Weiterhin untersuchten wir die Rolle von HIF-1α und HIF-2α in der Migration der PA-FB unter hypoxischen Bedingungen. Es zeigte sich, dass die PA-FB der siRNA-Kontrollgruppe sich analog zu den nativen Zellen verhielten, indem Hypoxie die Migration stark erhöhte (Abb. 27). Die Inhibition von HIF-1α reduzierte den Anstieg der Migration unter Hypoxie auf ein Minimum. Die Ausschaltung von HIF-2α verhinderte die Induktion der Migration unter hypoxischen Bedingungen komplett (Abb. 27).

Nachdem HIF nun sowohl die Proliferation, wie auch die Migration der PA-FB unter Hypoxie beeinflusst untersuchten wir im folgenden den Einfluss der beiden HIF Isoformen auf die Transdifferenzierung der PA-FB zu Myofibroblasten. Die si-random Kontrollgruppe zeigte, wie vorher die nativen Zellen (siehe Kapitel 4.4.1), keinen Anstieg der alpha-Smooth-Muscle-Cell-Aktin (α -SMA) Expression unter Hypoxie, dargestellt mit Hilfe des α -SMA Western Blots (Abb. 28). Sowohl siHIF-1 α , wie auch siHIF-2 α hatten keinen Einfluss auf die Expression von α -SMA.

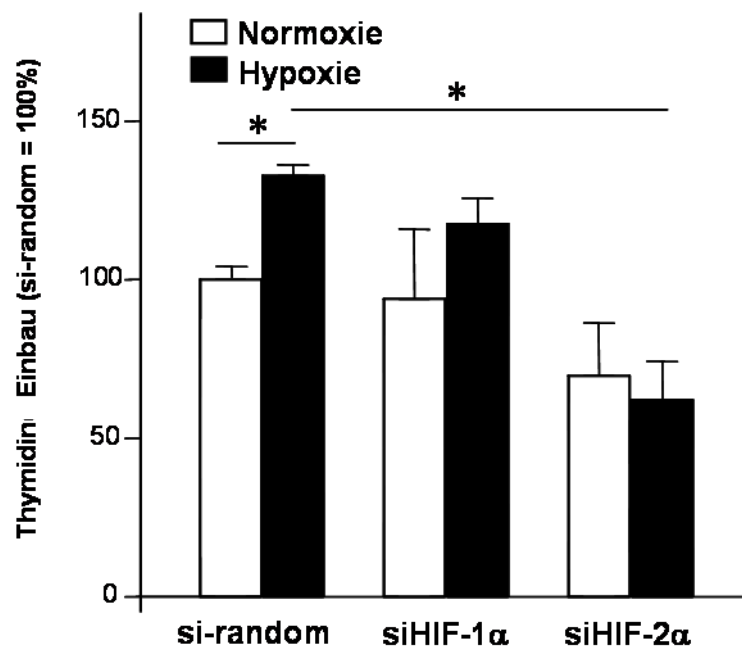


Abbildung 26: Proliferation PA-FB unter der Inhibition von HIF-1 α und HIF-2 α

Nach der Inkubationszeit der Transfektion mit si-random (Kontrolle), siHIF-1 α oder siHIF-2 α wurden die PA-FB für 24 Stunden synchronisiert und im Anschluss für weitere 24 Stunden Normoxie oder Hypoxie ausgesetzt. Das Thymidin wurde 12 Stunden vor Versuchsende hinzugegeben. Die Messung erfolgte im beta-Counter. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung bezogen auf die normoxische si-random Kontrolle(100%). Es wurden n = 6 Versuchsansätze durchgeführt (*, $P < 0,05$).

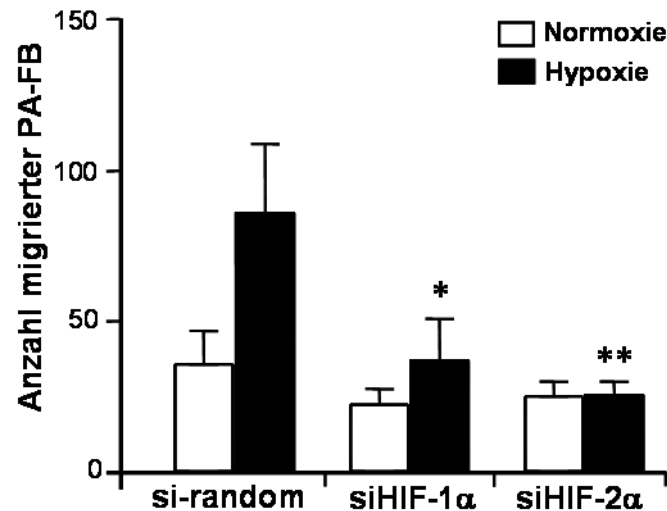


Abbildung 27: Migration PA-FB unter der Inhibition von HIF-1 α und HIF-2 α

Nach der Transfektion von si-random (Kontrolle), siHIF-1 α oder siHIF-2 α wurden die PA-FB trypsinisiert und gezählt. Jeweils 2000 Zellen wurden mit normalem Kulturmedium in die obere Hälfte der modifizierten Boyden Kammer gegeben. In der unteren Hälfte wurde auch normales Wachstumsmedium platziert. Die Zellen wurden für 24 Stunden in Normoxie und Hypoxie gestellt. Im Anschluss wurden die oberen PA-FB entfernt und die auf der unteren Seite des Filters befindlichen Zellen mit Kristall-Violett gefärbt. Die Anzahl der migrierten Zellen wurden im Lichtmikroskop bestimmt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n = 4$ Versuchsansätzen (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$).

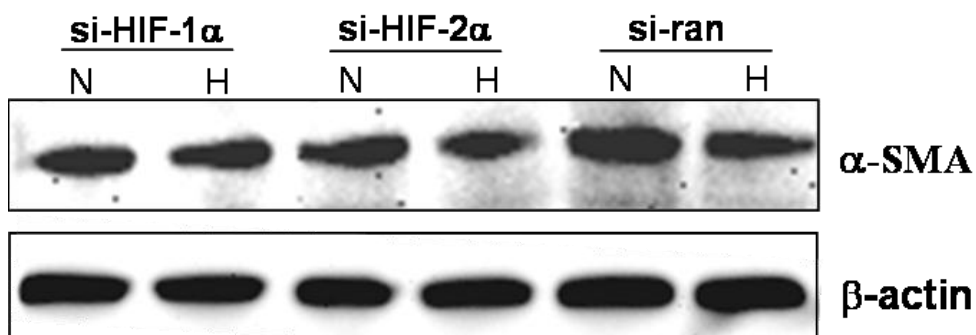


Abbildung 28: Die Expression von alpha-Smooth-Muscle-Cell Aktin unter den Inhibition von Hif-1 α und Hif-2 α

Pulmonalarterielle Fibroblasten wurden mit si-random (si-ran), siHIF-1 α oder siHIF-2 α transfiziert und im Anschluss für 72 Stunden unter Normoxie (N) und Hypoxie (H) kultiviert. Nach Proteinextraktion wurde die Expression von alpha-Smooth-Muscle-Cell-Aktin (α -SMA) und β -Aktin als Kontrolle untersucht. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus $n = 3$ Wiederholungen.

5. DISKUSSION

5.1 Ableitung der Arbeitshypothese

Der pulmonale Hochdruck trägt wesentlich zur Morbidität und Mortalität von Erwachsenen und Kindern mit verschiedenen Lungen- und Herzerkrankungen bei. Viele dieser Erkrankungen führen zu kontinuierlicher oder intermittierender Sauerstoffminderversorgung, die sowohl global wie auch in regional begrenzten Lungenabschnitten auftreten kann. In diesen hypoxischen Arealen kommt es zu einer Vasokonstriktion mit einer entsprechenden Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes. Bei Persistenz der Hypoxie mit der Vasokonstriktion werden vaskuläre Umbauprozesse induziert, das sogenannte „vaskuläre Remodelling“. Thema dieser Dissertation bildete die Untersuchung dieser vaskulären Umbauprozesse unter Hypoxie. Unsere Arbeitshypothese beinhaltete, erstens, dass die initiale Hyperplasie der Gefäßwand wesentlich durch eine gesteigerte Proliferation pulmonalarterieller Fibroblasten bedingt ist und zweitens, dass die Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren (HIF) in pulmonalarteriellen Fibroblasten eine zentrale Rolle in diesem Prozess spielen. Immer mehr experimentelle Untersuchungen belegen, dass die pulmonalarteriellen Fibroblasten (PA-FB) die ersten Zellen sind, die auf vaskulären Stress, wie Hypoxie oder Überdehnung, reagieren. Diese Stressantwort bezieht sich auf Proliferation, auf die vermehrte Produktion von extrazellulären Matrixproteinen und auf die gesteigerte Sekretion von Wachstumshormonen, welche direkt die glatten Muskelzellen der Media bezüglich Proliferation und Tonus beeinflussen (Meyrick and Reid, 1979; Sartore et al., 2001). Die Hypothese, dass die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF-1 α und HIF-2 α) die entscheidenden Transkriptionsfaktoren für das vaskuläre Remodelling unter Hypoxie sind wird durch eine Vielzahl von Studien der letzten Jahre gestützt. In heterozygoten *Knock-out* Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass HIF-1 α und HIF-2 α entscheidenden Einfluss auf die Pathogenese der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie haben (Iyer et al., 1998; Brusselmans et al., 2003). Vor diesem Hintergrund entstand die Hypothese, dass die verschiedenen HIF Isoformen entscheidenden Einfluss auf die vaskulären Umbauprozesse in der Adventitia der Pulmonalarterie haben und somit zur Entwicklung der pulmonalen Hypertonie beitragen.

5.2 Anwendung der siRNA zur Inhibition von Genen

Die Anwendung von siRNA zur Inhibition von Genen ist mittlerweile ein häufig verwendetes Werkzeug in der funktionellen Genomforschung. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Technik zur Analyse der Hypoxie-induzierbaren Faktoren in primären humanen pulmonalarteriellen Fibroblasten (PA-FB) angewendet und die Auswirkung der Inhibition auf

die physiologische Zellreaktion unter Hypoxie untersucht. Ein weit verbreitetes Problem bei der Arbeit in primär isolierten Zellkulturen ist die unterschiedliche Transfektionseffizienz, also das wirksame Einbringen von genetischem Material in die Zelle. Die herkömmliche Transfektion wird mit genetischem Material, kodiert auf geeigneten Vektoren, in Kombination mit zumeist liposomalen Trägersubstanzen vorgenommen. Die primären humanen pulmonalarteriellen Fibroblasten sind mit diesen Methoden nicht ausreichend zu transfizieren. Aus diesem Grund wurde im ersten Abschnitt dieser Arbeit die Etablierung der siRNA Anwendung an einer Zelllinie vorgenommen.

5.2.1 Etablierung der siRNA Technik

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Gen-Inhibition die synthetisierte siRNA genommen, die in ihrer Struktur wesentlich kleiner ist als herkömmliche Plasmide und somit die Passage der Zellmembran bei der Transfektion vereinfacht. Mit Hilfe einer generierten Luciferase exprimierenden Zelle konnte gezeigt werden, dass die Wirkung der Inhibition schon nach acht Stunden beginnt und zum Versuchsende nach 120 Stunden immer noch nachweisbar ist. Die Konzentration wurde von 10 bis 100 nM untersucht und für alle verwendeten Konzentrationsbereiche konnte eine eindeutige Inhibition nachgewiesen werden. In der Literatur wird die Inhibition mittels siRNA als lang andauernd, typischerweise mehrere Tage, spezifisch und effektiv beschrieben (Elbashir et al., 2001; Brummelkamp et al., 2002; Hoken et al., 2002). Die Spezifität der Inhibition zeigte sich in Studien, in denen Nukleotide der siRNA Sequenz ausgetauscht wurden. Das inhibitorische Potential wurde dadurch stark reduziert oder komplett aufgehoben. Schon der Austausch von einem Nukleotid in der zentralen Region der siRNA Sequenz reichte um die Wirkung zu unterbinden (Elbashir et al., 2001). Ein kontrovers diskutiertes Thema bezüglich der Verwendung von siRNA sind unspezifische Effekte. Diese Nebenwirkungen werden ausgelöst durch eine mögliche Immunreaktion und durch unspezifische Inhibitionseffekte. Eine Vielzahl von Studien beschreiben, dass durch die niedrige Konzentration von der verwendeten siRNA, durch die hohe Spezifität der Bindung an die Ziel mRNA und durch den schnellen Einbau der siRNA in die RISC-Komplexe die unspezifischen Effekte stark reduziert werden (Jackson et al., 2003; Chi et al., 2003; Semizarov et al., 2003). Andere Studien hingegen haben gezeigt, dass die Applikation von siRNA die Genexpression, abhängig von der verwendeten Konzentration, von dem Transfektionsreagenz und von der Art der verwendeten siRNA, unspezifisch beeinflussen kann (Persengiev et al., 2004; Sledz et al., 2003). Diese unspezifischen Effekte beinhalten die Stimulation von Genen, die in die Interferon (IFN) Antwort involviert sind. Die

folgende vergleichende Analyse der Microarray Gene Profile von HeLa Zellen transfiziert mit langer doppelsträngiger RNA, behandelt mit INF Typ 1 oder transfiziert mit Luciferase siRNA in hoher Konzentration (200nM) überlappte nur partiell (Persengiev et al., 2004). Dies zeigt, dass siRNA trotz möglicher unspezifischer Effekte ein potentes Werkzeug zur Inhibition von Genen darstellt. Durch eine gute Transfektionseffizienz und die effektive Inhibition ist der Einsatz in primär isolierten Zellen von besonderer Bedeutung

5.3 Die Rolle von HIF-1 α in der humanen Adenokarzinomzelllinie A549

5.3.1 HIF-1 α -Expression und HIF-1 α Inhibition

Die Hypoxie-induzierbaren Faktoren sind die wesentlichen Transkriptionsfaktoren in der Reaktion der Zellen auf Hypoxie. Wie bei allen anderen Proteinen auch, wird die verfügbare Proteinmenge von HIF-1 α über das Verhältnis von Synthese zu Abbau bestimmt. Die Proteinsynthese von HIF-1 α ist unabhängig vom Sauerstoffgehalt, im Gegensatz zum Proteinabbau, der unter Sauerstoffminderversorgung inhibiert wird und somit zu einem Anstieg des HIF-1 α Proteins in Hypoxie führt. Die Regulation von HIF-1 α findet fast ausschließlich auf Proteinebene statt, während die mRNA Expression unbeeinflusst bleibt (Semenza, 2003). In dieser Studie wurde zunächst ein siRNA Motiv für den Hypoxie-induzierbaren-Faktor-1 α (HIF-1 α) selektiert und auf die humane Lungen-Adenokarzinoma Zelllinie A549 angewendet. Wir konnten zeigen, dass die HIF-1 α mRNA unbeeinflusst durch Normoxie oder Hypoxie 70% zu inhibieren war. Die dargestellte Inhibition auf mRNA Ebene deckt sich nicht mit den Ergebnissen im Western Blot, wo ein fast vollständiger Verlust der HIF-1 α Bande zu beobachten war. Diese Diskrepanz erklärt sich durch die verwendeten HIF-1 α -Primer, welche die Bindungsstelle der siRNA nicht überspannen. Dadurch kommt es in der PCR auch zu einer Amplifikation von mRNA Strängen, die zwar schon gespalten aber noch nicht abgebaut sind. In der Analyse der Zeitkinetik zeigten sich analoge Ergebnisse zu den Luciferase siRNA Experimenten. Die Inhibition konnte bereits nach zehn Stunden eindeutig nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde auch in der Kontrollgruppe eine Reduktion der HIF-1 α Expression abhängig von der Inkubationszeit in Hypoxie gefunden. Dieser Effekt kann über einen Gegenregulationsmechanismus erklärt werden. Diese Gegenregulation ist abhängig von der Hypoxiedauer und wird hauptsächlich über die Hydroxylierung durch HIF- α Prolyl-4-Hydroxylasen vermittelt. Die HIF- α Prolyl-4-Hydroxylasen bewirken die Proline Hydroxylierung, mit folgender pVHL Bindung und somit dem Abbau des Proteins am Proteasom (D'Angelo et al., 2003; Appelhoff et al., 2004).

Die Induktion von HIF-1 α in Hypoxie führt zu einer Translokation in den Nukleus. Hier bildet sich der HIF-1 Transkriptionsfaktorkomplex, der über das Hypoxie-Responsive-Element (HRE) die entsprechenden Zielgene aktiviert. Im HRE-Reporter Assay konnten wir die spezifische Inhibition von HIF-1 α und damit die fehlende hypoxische Aktivierung der Zielgene *Vascular-Endothelial-Growth-Factor* (VEGF), *Phosphoglyceratkinase* (PGK), und *Häm-Oxygenase-1* (HO-1) darstellen. Neben diesen klassischen HIF-1 α Zielgenen sind über 80 weitere Zielgene bekannt, welche Einfluss auf die Angiogenese, den Glukose-Stoffwechsel, die Zellproliferation, die Zytoskelettstruktur, Apoptose oder den Gefäßtonus haben (Übersicht in Semenza, 2003).

5.3.2 HIF-1 α in der Zellzyklusregulation

Ein weiterer wichtiger Aspekt in der zellulären Reaktion unter Hypoxie sind die Änderungen im Wachstumsverhalten der Zellen (Carmeliet et al., 1998; Goda et al., 2003). Aus diesem Grund untersuchten wir die Auswirkungen der Inhibition von HIF-1 α in diesem Prozess. Hypoxie führte in den A549 Zellen zu einem Wachstumsstopp mit einer prozentualen Zunahme der Zellen in der G0 und G1 Phase des Zellzyklus. Durch die Inhibition von HIF-1 α konnte der Effekt umgekehrt werden, so dass unter hypoxischen Bedingungen mehr Zellen in die S-Phase eintraten. Diese Daten unterstreichen die Bedeutung von HIF-1 α in der Zellzyklus-Regulation in Hypoxie. Die dafür verantwortlichen HIF-1 α gesteuerten Effektorproteine sind noch nicht eindeutig geklärt. Erste Hinweise ergab eine Studie an Stammzellen mit einem inaktiviertem HIF-1 α Gen. Zellphysiologisch zeigten diese Zellen die gleichen Änderungen im Zellzyklus wie in unseren Experimenten. Gleichzeitig wurde aber auch gezeigt, dass die bekannten Hypoxie-abhängigen Zellzyklus-Regulatoren sowohl HIF-1 α abhängig, (p53 oder p21), wie auch HIF-1 α unabhängig (p27, GADD153) sind. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass es zwei unabhängige adaptive Antworten der Zellen auf Sauerstoffminderversorgung gibt (Carmeliet et al., 1998). Eine neuere Studie untersuchte die Auswirkung der HIF Inhibition in verschiedenen primären Zellen in Abhängigkeit von p53. Der Hypoxie induzierte Wachstumsstopp konnte zum einen als p53 unabhängig dargestellt werden und zum anderen führte die Inhibition von HIF-1 α auch in diesen Zellen zu einer Zunahme der S-Phase. Weiterhin wurden p21 und p27, beides Inhibitoren der Zyklin-abhängigen Kinasen, als HIF-1 α abhängige Zielgene identifiziert und HIF-1 somit als bedeutender Regulator des Zellzyklusarrestes in Hypoxie beschrieben (Goda et al., 2003b).

5.4 Hypoxie im vaskulären Remodelling von pulmonalarteriellen Fibroblasten

Die Beobachtung, dass Hypoxie pulmonale Hypertonie und damit strukturelle Veränderungen der Pulmonalarterien verursachen kann, wurde durch Untersuchungen von Bewohnern großer Höhe gemacht. Morphologisch fand sich in den Lungen eine erhöhte Muskularisierung der kleinen Pulmonalarterien, die normalerweise nur sehr wenig muskularisiert sind. Die größeren und weiter proximalen Arterien wiesen eine verdickte Media und Adventitia, was als Kennzeichen des Hypoxie-induzierten vaskulären Remodellings gilt, auf (Arias-Stella and Saldana, 1963). Immer mehr experimentelle Untersuchungen belegen, dass die pulmonalarteriellen Fibroblasten die ersten Zellen sind, die auf vaskulären Stress, wie Hypoxie oder Überdehnung, reagieren. Die Stressantwort bezieht sich in der Regel auf Proliferation, auf die vermehrte Produktion von extrazellulären Matrixproteinen und auf die gesteigerte Sekretion von Wachstumshormonen, welche direkt die glatten Muskelzellen der Media bezüglich Proliferation und Tonus beeinflussen (Meyrick and Reid, 1979; Sartore et al., 2001). In dieser Studie untersuchten wir deshalb primär isolierte humane pulmonalarterielle Fibroblasten bezüglich der Stressantwort auf Hypoxie und den Einfluss der Hypoxie-induzierbaren Faktoren in der zellulären Reaktion.

5.4.1 Auswirkungen von Hypoxie auf pulmonalarterielle Fibroblasten

Hypoxie führte in den pulmonalarteriellen Fibroblasten (PA-FB) zu einer starken Induktion der Proliferation mit einer Zunahme der in der S-Phase befindlichen Zellen und deutlich verringerter Apoptose. Gleichzeitig zur gesteigerten Proliferation konnte auch ein Anstieg der Migration unter Hypoxie beobachtet werden. Diese Ergebnisse erweitern damit frühere Untersuchungen in verschiedenen Tiermodellen (Stenmark et al., 2000; Stenmark and Mecham, 1997; Welsh et al., 2001) und zeigen, dass auch humane PA-FB mit massiver Proliferation auf Hypoxie reagieren. Interessanterweise ist diese proliferative Reaktion der Fibroblasten eine Besonderheit der Pulmonalarterie und findet sich nicht in der Adventitia der großen systemischen Arterien. Welsh et al. konnten an Ratten zeigen, dass Fibroblasten aus der Pulmonalarterie unter Hypoxie proliferieren, während die isolierten Zellen aus der Aorta keine Reaktion auf Hypoxie zeigten. Gleiches gilt auch für die gesteigerte Migration unter hypoxischen Bedingungen. Verantwortlich hierfür scheinen die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und insbesondere die MMP-2 zu sein, welche durch Hypoxie induziert werden (Frisdal et al., 2001). Die Fibroblasten in der Adventitia der Gefäße sind allerdings keine homogene Gruppe, sondern in ihrem Phänotyp und damit ihrer pathophysiologischen Reaktion unterschiedlich (Stenmark et al., 1999; Das et al., 2002; Das et al., 2000). In unseren Studien wurden keine Subpopulationen der isolierten Zellen untersucht, sondern

ausschließlich Zellen homogener Morphologie in niedriger Passagierung verwendet. Dies ist eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zu einer anderen Studien bezüglich der Transdifferenzierung zu Myofibroblasten in Hypoxie (Short et al., 2004). Short et al. zeigten, dass pulmonalarterielle Fibroblasten von Kälbern unter Hypoxie eine stärkere Expression von *alpha-Smooth-Muscle-Cell* Aktin (α -SMA), als Marker der zellulären Muskularisierung, aufwiesen. Diese vermehrte Expression stand in einem engen Zusammenhang mit der Induktion der Proliferation und die Autoren vermuten einen direkten Zusammenhang. Auch der Promoter des α -SMA kloniert aus Rattenzellen, zeigte eine Induzierbarkeit in Hypoxie (Short et al., 2004). In unseren Experimenten konnte keine Induktion des α -SMA unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen werden, auch der Zusammenhang zur Proliferation konnte an unseren Zellen nicht reproduziert werden. Allerdings handelte es sich bei den verwendeten Zellen um Populationen, die in der Lage sind sich in Myofibroblasten umzuwandeln. Dies zeigte die Zugabe von TGF-beta, ein bekannter Stimulus für Fibroblasten zur Transdifferenzierung, was zu einer Zunahme der α -SMA Expression führte. Neben den Subpopulationen ist die genauere Betrachtung der regulatorischen Region des α -SMA Gens von Ratte, Rind und des Menschen eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in den Beobachtungen (Min et al., 1990). Die Homologie in dieser Region beträgt nur circa 76%. Andererseits wurde auch in anderen Studien ein Anstieg der α -SMA Expression unter Hypoxie gezeigt, wie beispielsweise für humane renale Fibroblasten (Norman et al., 2000). Wie in Abbildung 30 dargestellt ist für die Transdifferenzierung der PA-FB zu Myofibroblasten ein Zusammenspiel der einzelnen Zellpopulationen und Zelltypen in der Gefäßwand möglich. Es wurde in früheren Studien bereits gezeigt, dass die Endothelzellen HIF-2 α abhängig Endothelin-1 produzieren, ein weiterer potenter Stimulus zur Transdifferenzierung (Semenza, 2004b). Dadurch zeigt sich, dass die Regulation von α -SMA in humanen pulmonalarteriellen Fibroblasten komplex ist und wahrscheinlich zwischen den einzelnen Spezies, wie auch den verschiedenen Zelltypen, variiert. Zusammenfassend lässt sich festhalten dass PA-FB in hypoxischen Bedingungen mit einem Anstieg der Proliferation, der Migration und möglicherweise der Transdifferenzierung reagieren. Diese pathophysiologischen Prozesse sind entscheidende Bestandteile des vaskulären Remodellings der pulmonalen Hypertonie.

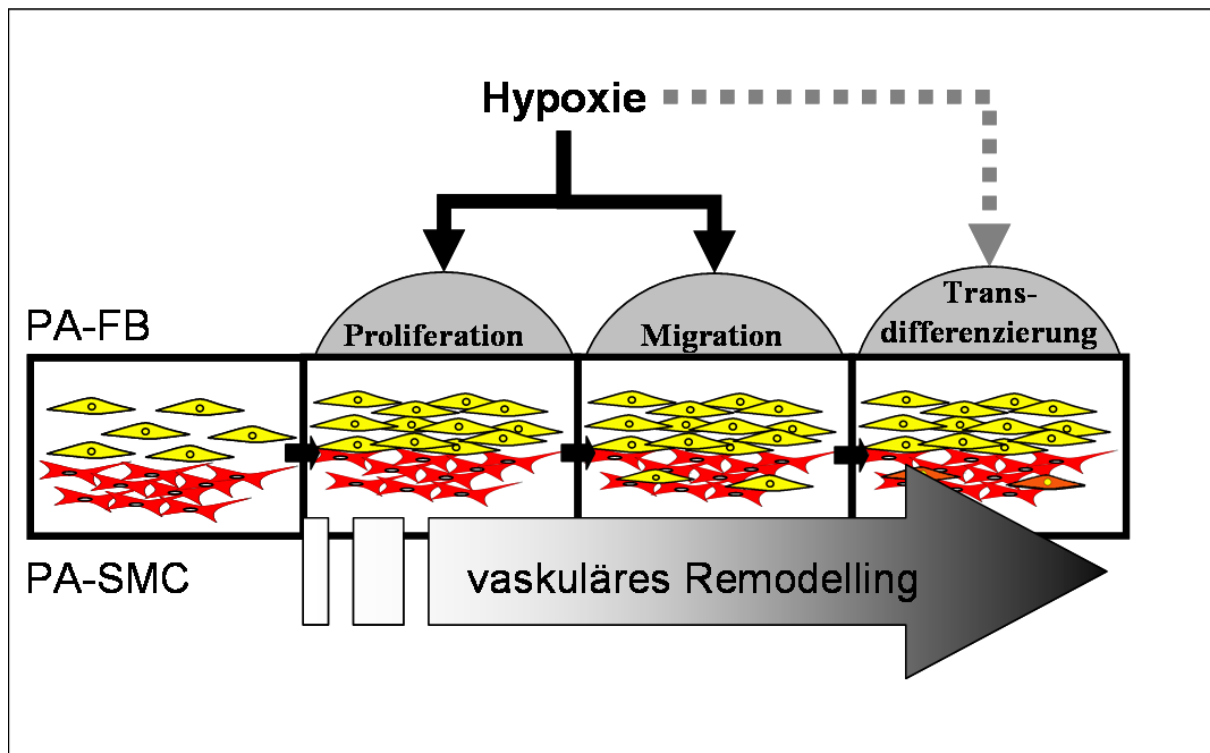


Abbildung 29: Schematische Darstellung des vaskulären Remodellings in pulmonalarteriellen Fibroblasten.

Im Rahmen des vaskulären Remodellings induziert die Sauerstoffminderversorgung Proliferation, Migration und Transdifferenzierung von PA-FB.

5.4.2 Die Hypoxie-induzierbaren Faktoren in pulmonalarteriellen Fibroblasten

Mit dem Fokus auf dem zugrunde liegenden Mechanismus der Hypoxieantwort pulmonalarterieller Fibroblasten untersuchten wir zuerst die Expression der Hypoxie-induzierbaren Faktoren in den primär isolierten Zellen. Dabei zeigte sich, dass unter Hypoxie HIF-1 α und HIF-2 α vermehrt nachweisbar waren. Daneben konnte die nukleäre Translokation der Transkriptionsfaktoren dargestellt werden, was eine typische Eigenschaft von HIF-1 α und HIF-2 α ist (Wenger et al., 1997; Ema et al., 1999). Im Gegensatz zu HIF-1 α war HIF-2 α auch schon unter normoxischen Bedingungen nachweisbar. Allerdings konnte die Expression nicht im Zellkern, wie unter Hypoxie, sondern nur im Zytoplasma nachgewiesen werden. Diese Beobachtung wurde auch schon in anderen Studien gemacht. So konnte auch Uchida et al. eine normoxische zytosolische Expression von HIF-2 α in den Adenokarzinomzellen A549 beobachten (Uchida et al., 2004). Eine weitere Gruppe zeigte diese Expression in Endothelzellen, so dass eine variierende Regulierung von HIF-1 α und HIF-2 α in bestimmten Zelltypen denkbar ist (Takahashi et al., 2004). Die Translokation von HIF-1 α und HIF-2 α in den Zellkern führte zur Aktivierung der zugehörigen Zielgene. In unseren Experimenten konnten wir auf mRNA Ebene zeigen, dass der vascular-endothelial-

Growth-Factor (VEGF), die Phosphoglyceratkinase (PGK), und der vascular-endothelial-Growth-Factor-Rezeptor-2 (VEGFR2 / KDR) induziert wurde. VEGF und PGK gelten als typische HIF-1 α und HIF-2 α Zielgene, während VEGFR2/KDR als HIF-2 α spezifisches Zielgen gilt (Elvert et al., 2003; Semenza, 2003). Die wesentliche Expression von VEGFR2/KDR findet sich in Endothelzellen, konnte aber auch in anderen Zellarten nachgewiesen werden. Damit in unseren Experimenten Kontaminationen mit Endothelzellen ausgeschlossen werden konnten, wurde ein Endothelmarker (CD 31 *platelet-endothelial cell adhesion molecule-1* = PECAM-1) und der VEGFR2/KDR in einer Ko-Immunzytofluoreszenz verwendet. Hierbei zeigte sich ein verstärktes Signal für VEGFR2/KDR unter Hypoxie bei gleichzeitig negativem Endothelmarker. Die HIF-2 α Abhängigkeit des VEGFR2/KDR zeigte sich auch bei dem Nachweis der Inhibition mittels siRNA. Während die Inhibition von HIF-1 α keine Auswirkungen auf die mRNA von VEGFR2/KDR hatte konnte in der siHIF-2 α Gruppe eine deutliche Reduktion festgestellt werden. Der genaue Mechanismus der HIF-2 α spezifischen Zielgen Aktivierung ist noch nicht eindeutig geklärt. Gegenwärtige Studien lassen aber vermuten, dass es eine HIF-2 α spezifische Sequenz in der Promotor-Region der jeweiligen Gene gibt, die ähnlich dem Hypoxie-responsiven Element funktioniert. Die ersten Hinweise hierfür ergaben die Studien bezüglich des VEGFR2/KDR und der endothelialen Stickoxydsynthetase (*endothelial nitric oxide synthase*; eNOS) (Elvert et al., 2003; Coulet et al., 2003). In einer anderen Studie an Hepatom- und Neuroblastomzellen konnte die hypoxische Induktion von Erythropoetin als stark HIF-2 α abhängig dargestellt werden (Warnecke et al., 2004). In dieser Studie vermuten die Autoren *Enhancer* Regionen zusätzlich zum Hypoxie-responsiven Element des Erythropoetin-Gens, welche die Spezifität für HIF-2 α vermitteln. Neben der spezifischen Inhibition des VEGFR2/KDR durch siHIF-2 α konnte die mRNA Expression von VEGF und PGK durch die Inhibition von HIF-1 α und HIF-2 α reduziert werden. Auch der direkte Proteinnachweis zeigte die vollständige Inhibition von HIF-1 α und HIF-2 α . Diese Inhibition ist zum einen auf das inhibitorische Potential der siRNA zurückzuführen und zum anderen bedingt durch die hohe Transfektionseffizienz von ca. 95%, die mit Hilfe von Fluoreszenzmarkierter siRNA in den einzelnen Experimenten kontrolliert wurde.

5.4.3 Die Rolle der Hypoxie-induzierbaren Faktoren im vaskulären Remodelling pulmonalarterieller Fibroblasten

Nach der Analyse der Hypoxieantwort der nativen PA-FB, der Darstellung der HIF-1 α bzw. HIF-2 α Expression und dem Nachweis der Inhibition mittels siRNA untersuchten wir im

abschließenden Schritt die Auswirkungen der Inhibition der einzelnen HIF Isoformen auf das Verhalten der PA-FB unter Hypoxie. Wir konnten nachweisen, dass die Proliferation unter Hypoxie HIF-2 α abhängig ist, wobei die Hypoxie induzierte Migration der Zellen von HIF-1 α und HIF-2 α abhängig war. Wie zu erwarten konnten keine Unterschiede in α -SMA Expression nach Inhibition von HIF-1 α oder HIF-2 α nachgewiesen werden. Die Darstellung der Abhängigkeit der Proliferation und Migration pulmonalarterieller Fibroblasten von den HIF-Isoformen ist von besonderem Interesse da es zukünftige differentielle Interventionsstrategien ermöglicht. Es bleibt unklar welche HIF-abhängigen Zielgene in diesen Prozessen hauptsächlich aktiviert werden und damit das Remodelling umsetzen. Die weitere Analyse der HIF Zielgene mit dem Schwerpunkt der spezifischen Zielgene ist daher ein wesentlicher Punkt weiterer Studien. Wie in Abbildung 30 schematisch skizziert ist die HIF abhängige Sekretion von Wachstumsfaktoren wie Endothelin-1 (ET-1), Plättchenwachstumsfaktor (PDGF = *platelet derived growth factor*), VEGF, transformierender Wachstumsfaktor- β (TGF- β = *transforming growth factor- β*) oder der basische Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF = *basic fibroblast growth factor*) bereits beschrieben worden. Für viele dieser Proteine konnte auch der Zusammenhang zur Pathogenese der pulmonalen Hypertonie gezeigt werden (Wort et al., 2001; Berg et al., 1998; Michiels et al., 1994; Pfeifer et al., 1998). Immer mehr neuere Studien allerdings stellen die Unterschiede der einzelnen Zielgene bezüglich der HIF Isoformen dar (Sowter et al., 2003; Carroll and Ashcroft, 2006). Es wird immer deutlicher, dass die Unterschiede welche HIF Isoform das bestimmte Zielgen aktiviert stark von der untersuchten Zellart abhängt. So kann beispielsweise VEGF in der einen Zellart von beiden Isoformen aktiviert werden und in einer anderen nur von HIF-1 α oder HIF-2 α . Unter Berücksichtigung von unseren Daten und der aktuellen Literatur kann von der Hypothese, dass HIF-1 α und HIF-2 α abhängig vom Zelltyp gemeinsame und spezifische Zielgene aktivieren ausgegangen werden.

Die von uns entdeckte Bedeutung von HIF-2 α in PA-FB ist von besonderem Interesse, da diese Isoform, im Gegensatz zum ubiquitär vorkommenden HIF-1 α , vorwiegend in der Lunge exprimiert wird. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten passen zu den Studien an heterozygoten HIF *knock out* Mäusen (Semenza, 2004; Yu et al., 1999; Brusselmans et al., 2003). In beiden Linien kam es zu einem verspäteten Beginn der pulmonalen Hypertonie unter Hypoxie, was durch die Messung des Rechts-/Linksherz-Verhältnisses, den rechtsventrikulären Druck und das Ausmaß der Muskularisierung dokumentiert wurde. Der fast komplette Schutz vor der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie in den heterozygoten

HIF-2 α *knock out* Mäusen ging mit den fehlenden morphologischen Veränderungen in der Adventitia der Pulmonalarterie einher und konnte auf den fehlenden Endothelin-1 und Katecholamin Anstieg unter Hypoxie zurückgeführt werden.

Unter Berücksichtigung der Literatur und der eigenen Ergebnisse könnte die Rolle der Hypoxie-induzierbaren Faktoren in den einzelnen Zellschichten der Pulmonalarterie wie in Abbildung 30 schematisch skizziert ablaufen. Hypoxie bewirkt in PA-FB abhängig von den Hypoxie-induzierbaren Faktoren eine Proliferation und eine Migration. Gleichzeitig kommt es zu einer Sezernierung verschiedener Effektorproteine, wie zum Beispiel Endothelin-1 oder VEGF. Dies hat wieder direkte Auswirkungen auf die pulmonalarteriellen Muskelzellen. Die Muskelzellen selber hypertrophieren und depolarisieren HIF abhängig. Die Hypertrophie wird weiter gefördert über die HIF abhängige Endothelin-1 Sezernierung aus pulmonalarteriellen Endothelzellen. Dieses sezernierte Endothelin-1 ist wahrscheinlich auch gemeinsam mit TGF-beta für die Transdifferenzierung der PA-FB verantwortlich.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass HIF-1 α und HIF-2 α entscheidende Transkriptionsfaktoren für die zelluläre Reaktion der PA-FB auf Hypoxie durch Steuerung der Proliferation und Migration sind. Diesbezüglich wurde eine unterschiedliche Abhängigkeit zu den einzelnen Isoformen festgehalten. Die essentielle Rolle von HIF-2 α eröffnet zukünftige therapeutische Interventionen.

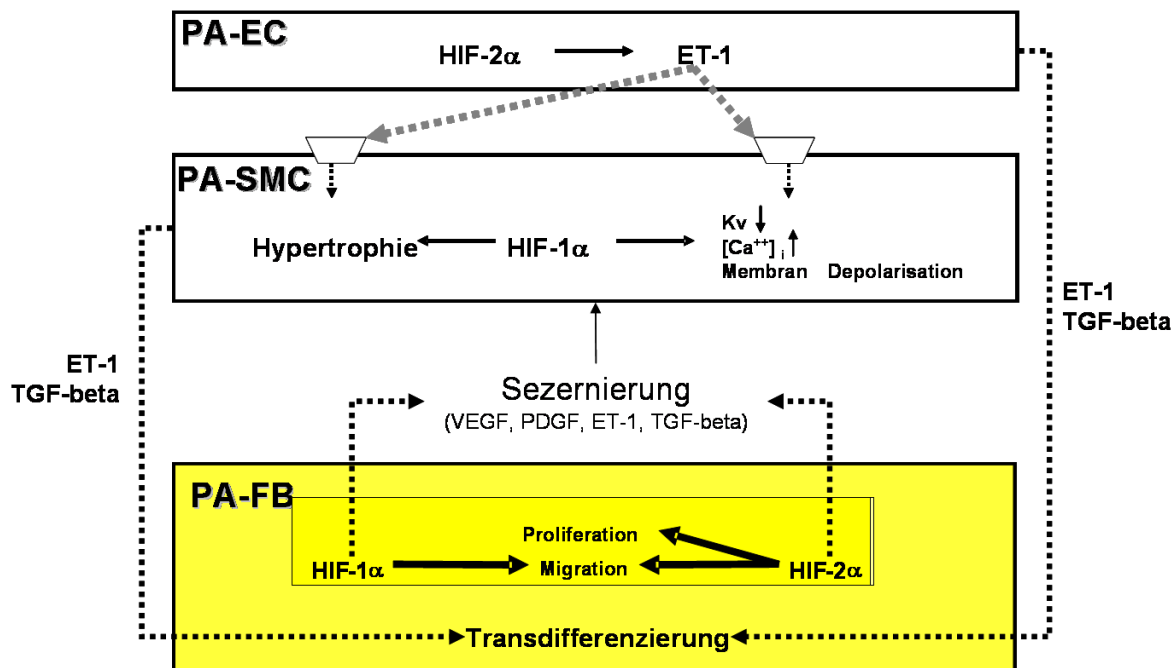


Abbildung 30: Schematische Darstellung des vaskulären Remodellings in pulmonalarteriellen Fibroblasten modifiziert nach Semenza 2002.

Hypoxie induziert die Produktion und Sekretion von Endothelin-1 (ET-1) in den pulmonalarteriellen Endothelzellen (PA-EC) über die Aktivierung von HIF-2 α . Nach der Sekretion bindet ET-1 an die Rezeptoren der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PA-SMC) und stimuliert somit die Hypertrophie und die Depolarisation der Membran. Hypoxie stimuliert HIF-1 α abhängig auch direkt die Membran-Depolarisation und die Hypertrophie. pulmonalarterielle Fibroblasten (PA-FB) proliferieren HIF-2 α und migrieren HIF-1 α und -2 α abhängig in Hypoxie. Die Transdifferenzierung zu Myofibroblasten wird möglicherweise über das Zusammenspiel der einzelnen Zelltypen in der Gefäßwand beeinflusst. Dazu ist eine HIF abhängige Sezernierung von Endothelin-1 (ET-1) oder des transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β) denkbar.

Kv = spannungsabhängige Kaliumkanäle; $[Ca^{++}]_i$ = intrazelluläre Ca^{++} Konzentration. (modifiziert nach Semenza G.L., 2002).

5.5 Diskussion der Befunde im aktuellen Kontext der Literatur

Das vaskuläre Remodelling in der pulmonalen Hypertonie ist ein Prozess, der bis heute noch nicht vollständig verstanden wird. Während die zellulären Funktionen der Endothelzellen in der Intima und die glatten Muskelzellen der Media intensiv untersucht worden sind wurde die Adventitia mit ihren verschiedenen Bestandteilen lange vernachlässigt. Dabei ist die Adventitia eine wichtige strukturelle Komponente, die aus einer extrazellulären Matrix, Fibroblasten, Blut- und Lymphgefäßen, Nerven-, Vorläuferzellen und Zellen des Immunsystems besteht. Immer mehr experimentelle Untersuchungen zeigen, dass die Adventitia eine Schlüsselrolle in der Reaktion der Arterien auf Stress jeglicher Art einnimmt (Übersicht in Stenmark et al., 2013). Die Zellen der Adventitia sind häufig die ersten, die auf Einflüsse wie Hormone, Entzündung, Hypoxie, Ischämie oder Gefäßdehnung reagieren. Dabei stellen die Fibroblasten das Gerüst der Adventitia und sind damit der entscheidende Zelltyp dieser Zellschicht (Übersicht in Stenmark et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von Hypoxie auf das Wachstumsverhalten von pulmonalarteriellen Fibroblasten untersucht. Der Schwerpunkt der Dissertation war dabei die Analyse der Funktionen der Hypoxie-induzierbaren Faktoren als wichtigen, in Hypoxie aktiven Transskriptionsfaktor. Wir konnten zeigen, dass Hif-1 α die Migration und Hif-2 α die Migration und Proliferation unter Hypoxie stimuliert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die verschiedenen HIF Isoformen unterschiedliche Auswirkungen auf die zelluläre Antwort der pulmonalarteriellen Fibroblasten unter hypoxischen Bedingungen haben. Die unterschiedlichen Auswirkungen der HIF Isoformen auf die Zellen ist aber grundsätzlich abhängig vom Zelltyp. Ahmad et al. zeigten in einer gerade veröffentlichten Publikation die differenzierten Funktionen der HIF Isoformen in Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Pulmonalarterie. Die pulmonalarteriellen Endothelzellen reagierten mit Proliferation auf Hypoxie. Die adenovirale Überexpression von HIF-2 α führte zu einer weiteren Steigerung der Proliferation während die Überexpression von HIF-1 α keine Auswirkungen hatte. Beide Isoformen steigerten aber die endotheliale Migration. In dem durchgeführten Angiogenese Assay konnte eine stärkere Stimulation der Angiogenese für HIF-2 α , verglichen mit HIF-1 α , dokumentiert werden (Ahmad A. et al., 2013). Auch die pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen zeigten eine Steigerung der Proliferation unter chronischer Hypoxie. Die Überexpression von HIF-1 α führte zu einer weiteren Stimulation der Proliferation, während die Überexpression von HIF-2 α keinen Effekt hatte. Diese Studie

demonstrierte, dass HIF-2 α ein entscheidender Regulator in den Endothelzellen und HIF-1 α in den glatten Muskelzellen der Pulmonalarterie ist. Die Proliferation der glatten Muskelzellen unter Hypoxie und die Rolle der Hypoxie induzierbaren Faktoren wird vielfach kontrovers diskutiert. Es scheint sowohl unterschiedliche Reaktionen der Zellen auf die Art der Hypoxie (akute versus chronische Hypoxie) zu geben als auch verschiedene Subpopulationen glatter Muskelzellen, die wiederum differenziert auf hypoxische Bedingungen reagieren (Kim et al., 2013; Howard et al., 2012). Diese Subpopulationen wurden von Howard detailliert charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine normoxische und eine hypoxische Population der glatten Muskelzellen in den distalen Pulmonalarterien zu finden ist. Die hypoxische Population proliferiert in vitro auf den Stimulus Hypoxie, während die normoxische Population mit Apoptose reagiert. Für die differentielle Reaktion der Subpopulationen glatter Muskelzellen wurde HIF-1 α verantwortlich gemacht, da die Überexpression von HIF-1 α in diesen Studien einen vergleichbaren Effekt hatte. Dieses Phänomen und der Nachweis der diversen Subpopulationen konnte auch in vivo erbracht werden. Hierzu wurden Lungenteilresektate von Patienten mit einem Lungemphysem untersucht. Es zeigte sich in den glatten Muskelzellen der Media, dass sowohl die Induktion der Proliferation als auch der Apoptose stark ausgeprägt ist (Howard et al., 2012). Verstärkt wird diese Reaktion über das Zusammenspiel pulmonalarterieller Fibroblasten und glatter Muskelzellen. Unter hypoxischen Bedingungen werden verschiedene, HIF abhängige Substanzen von pulmonalarteriellen Fibroblasten in die extrazelluläre Matrix sezerniert und somit die umgebenden Zellschichten beeinflusst (Semenza, 2002; Stenmark et al., 2013). So ist beispielsweise Endothelin-1 (ET-1) ein wichtiger Stimulus für die glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien. Sezerniert über die Endothelzellen oder die pulmonalarteriellen Fibroblasten führt Endothelin-1 rezeptorvermittelt zu einer Membrandepolarisation und zur Hypertropie glatter Muskelzellen (Übersicht in Semenza, 2002). Eine neue Arbeit von Pisarcik et al. stellte die Interaktion der verschiedenen Zellarten über die extrazelluläre Matrix unter der Kontrolle der Hypoxie-induzierbaren Faktoren dar. In dieser Untersuchung wurde die Auswirkung von Endothelin-1 auf die direkte HIF-1 α Expression in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen analysiert (Pisarcik et al., 2013). Sowohl Hypoxie als auch ET-1 konnten die Expression von HIF-1 α stimulieren. Gleichzeitig wurde über beide Stimuli die Prolylhydroxylase 2, welche die sauerstoffabhängige Degradation von HIF-1 α steuert, inhibiert (Pisarcik et al., 2013). Dieser Effekt wurde vermittelt über eine Steigerung des intrazellulären Calciums, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und die Aktivierung von ERK1/2 (Pisarcik et al., 2013).

Gemeinsam mit unseren Daten bezüglich der pulmonalarteriellen Fibroblasten verdeutlicht dies die Bedeutung der Interaktion der verschiedenen Zellschichten der Pulmonalarterie. Allerdings ist hierbei die Rolle der Hypoxie-induzierbaren Faktoren noch nicht vollständig geklärt und es zeigen sich weiterhin kontroverse Ergebnisse zwischen den Arbeitsgruppen. Dies unterstreicht auch eine kürzlich publizierte Arbeit über die Rolle von HIF-1 α in glatten Muskelzellen. Wie oben bereits erläutert ist HIF-1 α bisher in den pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen als entscheidender Faktor für die Depolarisation der Membran und somit für die Vasokonstriktion und die folgende Hypertrophie der glatten Muskelzellen definiert worden (Übersicht in Semenza, 2002). Die Untersuchungen von Kim et al. zeigten allerdings kontroverse Ergebnisse. In dieser Studie wurden genetisch veränderte Mäuse, die eine isolierte HIF-1 α Deletionsmutation in den glatten Muskelzellen aufwiesen, gezüchtet. Mutationstragende Mäuse wiesen einen höheren pulmonalarteriellen Druck und somit eine größere Rechtsherzbelastung als die Kontrollmäuse unter Normoxie sowie akuter und chronischer Hypoxie auf. Als zugrundeliegender Mechanismus wurde eine verstärkte Myosin-Leichtketten-Phosphorylierung, als Marker für den Tonus der Muskulatur nachgewiesen (Kim et al., 2013). Gerade diese Studie liefert einen Beleg über die kontroverse Rolle der Hypoxie-induzierbaren Faktoren im vaskulären Remodelling der pulmonalarteriellen Hypertonie und deutet auf weitere Einflussfaktoren unabhängig von HIF hin. Neben den einzelnen Zellschichten der Pulmonalarterie und den Regulationen in den Zellen selber ist die extrazelluläre Matrix ein entscheidender Faktor in der Entwicklung der pulmonalen Hypertonie. Die extrazelluläre Matrix mit ihrer Summe an Bestandteilen bestimmt die Mikroumgebung, die wiederum die einzelnen Zellschichten beeinflusst. Neben den von HIF gesteuerten Effektorproteinen in der extrazellulären Matrix wurden auch HIF unabhängige Proteine entdeckt. So konnten Anwar et al. 2012 zeigen, dass Osteopontin in Fibroblasten, isoliert aus Pulmonalarterien von chronisch hypoxischen und hypertensiven Kälbern, stark exprimiert wird. Osteopontin ist ein Glykoprotein, dass in vielen Krebsarten als starker Stimulus für Proliferation und Migration identifiziert wurde (Anwar et al., 2012). In dieser Untersuchung wurde deutlich, dass Osteopontin und der zugehörige Rezeptor in den pulmonalarteriellen Fibroblasten unter Hypoxie verstärkt exprimiert wird. Diese Überexpression führte zu einer gesteigerten Proliferation, Migration und Invasion der Fibroblasten in vivo und in vitro (Anwar et al., 2012). In einer weiteren Studie von Burke konnte gezeigt werden, dass anhaltende Hypoxie zu einer chronischen Entzündungsreaktion in der Pulmonalarterie führt. Hierbei sammeln sich dendritische Zellen und Monozyten in der extrazellulären Matrix. Der Stimulus zur Invasion diesen mononukleären Zellen wird über die

gesteigerte Sezernierung von SDF-1 (stromal cell-derived factor-1), VEGF, Osteopontin und beispielsweise TGF-beta getriggert (Burke et al., 2009). In Normoxie wird die Genexpression und damit die Sezernierung dieser Faktoren in die extrazelluläre Matrix wieder auf Kontrollniveau herabreguliert. Parallel normalisiert sich die monozytäre Migration in die extrazelluläre Matrix (Burke et al., 2009). Diese Studien zeigen die Komplexität des vaskulären Remodellings. Nicht nur die regulären Zellen der Pulmonalarterie haben entscheidenden Einfluss auf den Umbau des Gefäßes, sondern auch die Invasion inflammatorischer Zellarten und die jeweiligen Interaktionen untereinander.

Zusammenfassend konnten wir mit der Studie über die Isoformen der Hypoxie-induzierbaren Faktoren in pulmonalarteriellen Fibroblasten einen wichtigen Teilbereich des vaskulären Remodellings erklären. In neueren Untersuchungen konnten weitere Einflüsse von HIF in den einzelnen Zellschichten gefunden werden und die einzelnen Interaktionen genauer erklärt werden. Überdies hinaus gibt aber eine Vielzahl von weiteren HIF unabhängigen Einflussfaktoren, die alle in Ihrer Summe zum irreversiblen Gefäßumbau unter Hypoxie führen.

5.6 Perspektiven und weiterführende Experimente

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente wurden alle ausschließlich mit primär isolierten humanen pulmonalarteriellen Fibroblasten durchgeführt und spiegeln somit nicht das Gesamtbild der strukturellen Veränderungen des vaskulären Remodellings im lebenden Organismus wieder. Weiterhin kann über das Zellkulturmodell die Frage, ob die kurzfristige Inhibition von HIF vor der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie schützt, oder ob die Inhibition sogar eine bestehende pulmonale Hypertonie beeinflussen kann, nicht beantwortet werden. Eine Umsetzung der Zellkulturexperimente in ein Tiermodell wäre hierfür notwendig. Allerdings existiert zurzeit keine geeignetes Verfahren zur erfolgreichen siRNA Transfektion der Pulmonalarterie in vivo. Im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit von Florentine Kamlah unter der Leitung von PD Dr. J. Hänze und PD Dr. F. Rose wurde die therapeutische Anwendung von siRNA untersucht. Experimentell analysierten wir zunächst eine effiziente siRNA Applikationsmethode. In der Arbeit „*In vivo siRNA-Transfektion der Lunge und des Bronchialkarzinoms zur Analyse der Hypoxie-induzierbaren Faktoren in der Tumorprogression*“ (Kamlah F., 2007) wurden verschiedene Applikationswege (intratracheal, intraperitoneal, intravenös) mit verschiedenen Trägerlösungen (kationische Liposomen und

kationische Polymere) kombiniert und die Transfektion der Lunge und des Bronchialkarzinoms analysiert. Wie in Abbildung 31 dargestellt konnte mittels Rechtsherzkatheter eine erfolgreiche Transfektion der Lunge und der Pulmonalarterie erreicht werden. Allerdings waren nicht alle untersuchten Abschnitte gleichmäßig transfiziert, so dass eine weitere Verbesserung des etablierten Protokolls zurzeit bearbeitet wird. Die vergleichende Untersuchung im Tumormodell ging mit einer weitaus größeren Transfektionseffizienz einher. Wie in Abbildung 32 dargestellt konnte mittels einer einfachen intraperitonealen Applikation der gesamte Tumor transfiziert werden. Dieses Verfahren der Tumortransfektion konnte im folgenden Schritt an subkutanen A549 Tumoren im Mausmodell angewendet werden. Dazu inhibierten wir HIF-1 α und HIF-2 α über einen Zeitraum von 4 Wochen und analysierten das Tumorwachstum. Es konnte eine Reduktion der Tumorgroße mit der Behandlung von siHIF-2 α erreicht werden. Diese Daten zeigen, dass siRNA ein geeignetes Werkzeug zur Geninhibition in vivo darstellt. Die Analyse der therapeutischen Potenz setzt allerdings die Erreichbarkeit des Zielgewebes voraus. Für die Transfektion der Pulmonalarterie und damit der weiteren Analyse der Hypoxie-induzierbaren Faktoren als therapeutisches Ziel in der pulmonalen Hypertonie ist die Verbesserung des bestehenden Verfahrens notwendig, um alle beteiligten Areale der Gefäße effizient zu transfizieren und damit HIF auszuschalten.

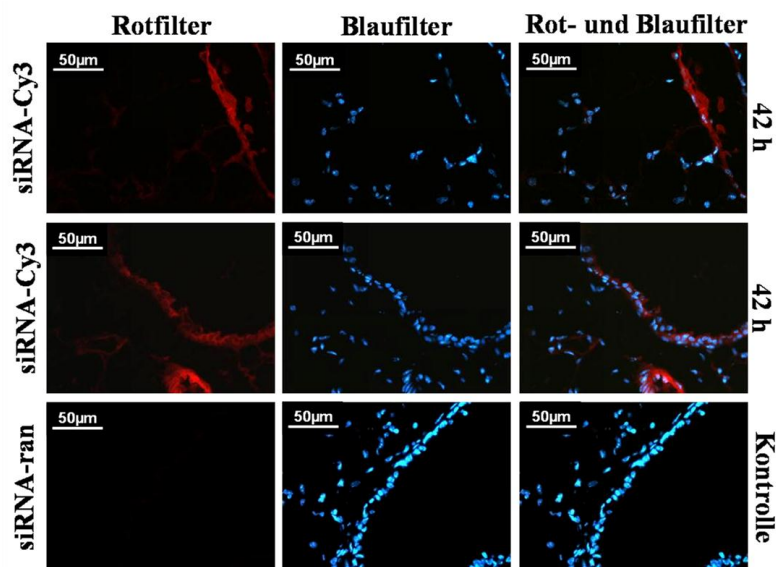


Abbildung 31: Transfektion der gesunden Lunge über den implantierten Rechtsherzkatheter mit siRNA-Cy3 und in vivo jetPEI™.

Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der siRNA behandelten Mauspulmonen. (Kamlah F., 2007)

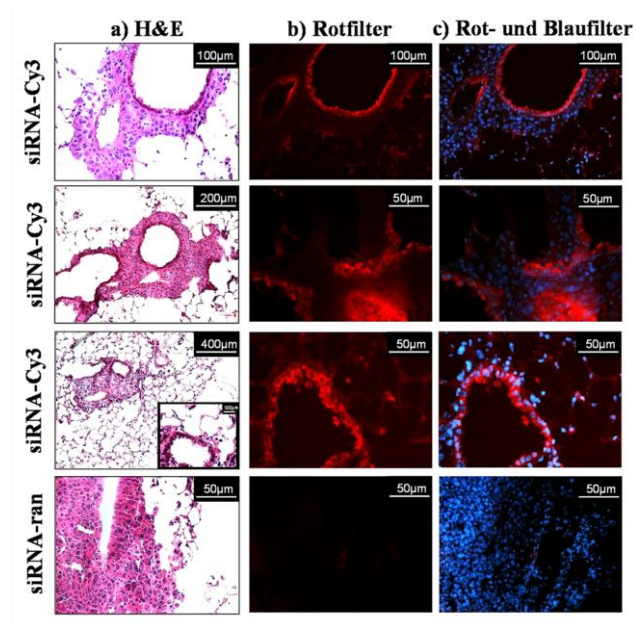


Abbildung 32: Transfektion des Lewis-Lung-Karzinoms der Lunge über den implantierten Rechtsherzkatheter mit siRNA-Cy3 und Lipofectamine™ 2000.

Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der siRNA behandelten Maoslungen mit sekundär instillierten Bronchialkarzinomen. (Kamlah F., 2007)

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Hypoxie induzierte Proliferation der pulmonalarteriellen Fibroblasten in der Adventitia der kleinen intrapulmonalen Arterien ist als frühes Stadium in der Entwicklung der pulmonalen Hypertonie und des Cor pulmonale beschrieben worden. Wir untersuchten die Rolle der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF-1 α und HIF-2 α) in primären humanen pulmonalarteriellen Fibroblasten (FB-PA) unter hypoxischen Bedingungen. Der Schwerpunkt lag in der Differenzierung zwischen den beiden HIF-Isoformen und die Bedeutung der Inhibition für die pathophysiologische Reaktion der PA-FB unter Hypoxie. Dazu wurde zunächst die RNA interferenz zur Inhibition von HIF an den humanen Adenokarzinomzellen (A549) etabliert. Es zeigte sich eine potente Inhibition von HIF-1 α , die Auswirkungen auf die Zellzyklusregulation unter Hypoxie hatte. Vor der Anwendung dieser Methode an den primären Zellen wurden zunächst die Reaktion der PA-FB auf Hypoxie und die Expression der Hypoxie-induzierbaren Faktoren untersucht. Unter hypoxischen Bedingungen reagierten die PA-FB mit einer starken proliferativen Antwort. Im Zellzyklus bewirkte die Hypoxie eine Verschiebung der PA-FB in die S-Phase, wobei die Apoptose gleichzeitig supprimiert wurde. Neben der Steigerung der Proliferation induzierte Hypoxie auch die Migration der PA-FB. Die Expression von *alpha-Smooth-Muscle-Cell* Aktin, als Indikator der Transdifferenzierung zu Myofibroblasten, blieb jedoch unverändert. Die folgende Analyse der Expression konnte HIF-1 α und HIF-2 α auf mRNA-Ebene konstitutiv nachweisen. Auf Protein-Ebene zeigten beide HIF-Isoformen eine starke Induktion unter Hypoxie und unter normoxischen konnte nur das HIF-2 α Protein zytosolisch und perinukleäre nachgewiesen werden. Die Aktivierung der beiden Subtypen und somit die Funktionalität als Transkriptionsfaktor wurde mittel RT-PCR für die Zielgene von HIF-1 α und HIF-2 α dargestellt. Durch siRNA für HIF-1 α und HIF-2 wurde diese Aktivierung sowohl für die Phosphoglycerat Kinase (PGK), als auch für den Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibiert. Weiterhin bedingte die Suppression von HIF-1 α , wie auch von HIF-2 α einen Stopp der Hypoxie induzierten Migration, wobei die Proliferation nur durch siRNA gegen HIF-2 α zu inhibieren war.

PA-FB proliferieren und migrieren unter Hypoxie HIF gesteuert, so dass eine Transdifferenzierung in der Media der pulmonalarteriellen Gefäße ermöglicht wird. Die Proliferation ist dabei abhängig von HIF-2 α während die Migration durch HIF-1 α und HIF-2 α gesteuert wird. Die Transdifferenzierung in PA-FB ist weder direkt durch Hypoxie induziert noch HIF abhängig. Diese Ergebnisse demonstrieren die wichtige Bedeutung der Hypoxie induzierten Faktoren in den PA-FB für die Entwicklung der pulmonalen Hypertonie.

7. SUMMARY

Proliferation of adventitial fibroblasts of small intrapulmonary arteries (PA-FB) has been disclosed as an early event in the development of pulmonary hypertension and cor pulmonale in response to hypoxia. We investigated the role of hypoxia-inducible transcription factors (HIF) in human PA-FB exposed to hypoxia. Particular attention was paid to a putative role of hypoxia-inducible factors, with two major acting subtypes being currently known (HIF-1 α , HIF-2 α). Both subtypes regulate their target gene via the hypoxia-responsive elements (HRE). For determination between the different HIF Isoforms RNA-interference for HIF-1 α and HIF-2 α was established using the human adenocarcinoma cell line A549. In this system a potent inhibition of HIF-1 α with consequences in cell cycle regulation was observed.

Further investigations with primary cultures of PA-FB displayed a strong mitogenic response to 24 h of hypoxia, whereas the rate of apoptosis was significantly suppressed. In addition, the migration of PA-FB was strongly increased under hypoxic conditions but not the expression of α -smooth muscle cell actin. Hypoxia induced a marked up-regulation (protein level) of both HIF-1 α and HIF-2 α , alongside with nuclear translocation of these transcription factors. Specific inhibition of either HIF-1 α or HIF-2 α was achieved by RNA interference technology, as proven by HIF-1 α and HIF-2 α mRNA and protein analysis and expression analysis of HIF downstream target genes. With the use of this approach, the hypoxia-induced proliferative response of the PA-FB was found to be solely HIF-2 α dependent, whereas the migratory response was significantly reduced by both HIF-1 α and HIF-2 α interference. In conclusion, HIF up-regulation is essential for hypoxic cellular responses in human pulmonary artery adventitial fibroblasts such as proliferation and migration, mimicking the pulmonary hypertensive phenotype in vivo. Differential HIF subtype dependency was noted, with HIF-2 α playing a predominant role, which may offer future intervention strategies.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Ahmad, A., Ahmad, S., Malcolm, K.C., Miller, S., Hendry-Hofer, T., Schaack, J.B., White, C.W. (2013). Differential Regulation of Pulmonary Vascular Cell Growth by HIF-1 α and HIF-2 α . *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 49, 78-85.

Anwar, A., Li, M., Frid, M.G., Kumar, B., Gerasimovskaya, E.V., Riddle, S.R., McKeon, B.A., Thukaram, R., Meyrick, B.O., Fini, M.A., Stenmark, K.R. (2012). Osteopontin is an endogenous modulator of the constitutively activated phenotype of pulmonary adventitial fibroblasts in hypoxic pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 303, 1-11.

Appelhoff, R.J., Tian, Y.M., Raval, R.R., Turley, H., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Gleadle, J.M. (2004). Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J. Biol. Chem.* 279, 38458-38465.

Arias-Stella, J., Saldana, M. (1963). The terminal portion of the pulmonary arterial tree in people native to high altitudes. *Circulation.* 28:915-25.

Belknap, J.K., Orton, E.C., Ensley, B., Tucker, A., Stenmark, K.R. (1997). Hypoxia increases bromodeoxyuridine labeling indices in bovine neonatal pulmonary arteries. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16, 366-371.

Benninghoff, A. (1994). *Anatomie: Makroskopische Anatomie; Embryologie und Histologie des Menschen.* Urban Schwarzenberg München, Wien.

Berg, J.T., Breen, E.C., Fu, Z., Mathieu-Costello, O., West, J.B. (1998). Alveolar hypoxia increases gene expression of extracellular matrix proteins and platelet-derived growth factor-B in lung parenchyma. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 158, 1920-1928.

Botto, L., Beretta, E., Daffara, R., Miserocchi, G., Palestini, P. (2006). Biochemical and morphological changes in endothelial cells in response to hypoxic interstitial edema. *Respir. Res.* 13, 7:7.

Bradford, J., Dean, H. (1894). The pulmonary circulation. *J. Physiol.* 16, 34-96.

Brummelkamp, T.R., Bernards, R., Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science.* 296, 550-553.

- Brusselmans, K., Compernelle, V., Tjwa, M., Wiesener, M.S., Maxwell, P.H., Collen, D., Carmeliet, P. (2003). Heterozygous deficiency of hypoxia-inducible factor-2alpha protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia. *J. Clin. Invest.* 111, 1519-1527.
- Burke, D.L., Frid, M.G., Kunrath, C.L., Karoor, V., Anwar, A., Wagner, B.D., Strassheim, D., Stenmark, K.R. (2009). Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 297, 238-50.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C.J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R.K., Collen, D., Keshert, E. (1998). Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* 394, 485-490.
- Carroll, V.A., Ashcroft, M. (2006). Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha versus HIF-2alpha in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway. *Cancer Res.* 66, 6264-6270.
- Chi, J.T., Chang, H.Y., Wang, N.N., Chang, D.S., Dunphy, N., Brown, P.O. (2003). Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 6343-6346.
- Coulet, F., Nadaud, S., Agrapart, M., Soubrier, F. (2003). Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. *J. Biol. Chem.* 278, 46230-46240.
- Crystal, R.G., West, J.B., Barnes, P.J., Cherniak, N.S., Weibel, E.R. (1991). *The Lung*. Scientific Foundations, Raven Press, New York 2.
- D'Angelo, G., Duplan, E., Boyer, N., Vigne, P., Frelin, C. (2003). Hypoxia up-regulates prolyl hydroxylase activity: a feedback mechanism that limits HIF-1 responses during reoxygenation. *J. Biol. Chem.* 278, 38183-38187.
- Das, M., Bouche, D.M., Moore, M.J., Hopkins, D.C., Nemenoff, R.A., Stenmark, K.R. (2001). Hypoxia-induced proliferative response of vascular adventitial fibroblasts is
-

dependent on g protein-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 276, 15631-15640.

Das, M., Dempsey, E.C., Bouchee, D., Reyland, M.E., Stenmark, K.R. (2000). Chronic hypoxia induces exaggerated growth responses in pulmonary artery adventitial fibroblasts: potential contribution of specific protein kinase c isozymes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22, 15-25.

Das, M., Dempsey, E.C., Reeves, J.T., Stenmark, K.R. (2002). Selective expansion of fibroblast subpopulations from pulmonary artery adventitia in response to hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 282, 976-986.

Davies, P., Burke, G., Reid, L. (1986). The structure of the wall of the rat intraacinar pulmonary artery: an electron microscopic study of microdissected preparations. *Microvasc. Res.* 32, 50-63.

Deng, Z., Haghighi, F., Helleby, L., Vanterpool, K., Horn, E.M., Barst, R.J., Hodge, S.E., Morse, J.H., Knowles, J.A. (2000). Fine mapping of PPH1, a gene for familial primary pulmonary hypertension, to a 3-cM region on chromosome 2q33. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 161, 1055-1059.

Durmowicz, A.G., Stenmark, K.R. (1999). Mechanisms of structural remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Pediatr. Rev.* 20, 91-102.

Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411, 494-498.

Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188-200.

Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20, 6877-6888.

Elvert, G., Kappel, A., Heidenreich, R., Englmeier, U., Lanz, S., Acker, T., Rauter, M., Plate, K., Sieweke, M., Breier, G., Flamme, I. (2003). Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J. Biol. Chem.* 278, 7520-7530.

- Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J., Sogawa, K., Poellinger, L., Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J.* 18, 1905-1914.
- Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., Fujii-Kuriyama, Y. (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4273-4278.
- Eul, B., Rose, F., Krick, S., Savai, R., Goyal, P., Klepetko, W., Grimminger, F., Weissmann, N., Seeger, W., Hanze, J. (2006). Impact of HIF-1alpha and HIF-2alpha on proliferation and migration of human pulmonary artery fibroblasts in hypoxia. *FASEB J.* 20, 163-165.
- Euler, U.S., Liljestrand, G. (1946). Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol. Scand.* 12, 301-320.
- Fedele, A.O., Whitelaw, M.L., Peet, D.J. (2002). Regulation of gene expression by the hypoxia-inducible factors. *Mol. Interv.* 2, 229-243.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391, 806-811.
- Fishman, A.P. (1998). Etiology and pathogenesis of primary pulmonary hypertension: a perspective. *Chest.* 114, 242-247.
- Frisdal, E., Gest, V., Vieillard-Baron, A., Levame, M., Lepetit, H., Eddahibi, S., Lafuma, C., Harf, A., Adnot, S., Dortho, M.P. (2001). Gelatinase expression in pulmonary arteries during experimental pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 18, 838-845.
- Galiè, N., Hoeper, M.M., Humbert, M., Torbicki, A., Vachiery, J.L., Barbera, J.A., Beghetti, M., Corris, P., Gaine, S., Gibbs, J.S., Gomez-Sanchez, M.A., Jondeau, G., Klepetko, W., Opitz, C., Peacock, A., Rubin, L., Zellweger, M., Simonneau, G.; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). (2009). Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS),
-

endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J.* 30, 2493-537.

Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Fiska, A., Koukourakis, M.I. (2006). Hypoxia-inducible factor-2 alpha (HIF-2 alpha) induces angiogenesis in breast carcinomas. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 14, 78-82.

Goda, N., Dozier, S.J., Johnson, R.S. (2003). HIF-1 in cell cycle regulation, apoptosis, and tumor progression. *Antioxid. Redox. Signal.* 5, 467-473.

Goldberg, M.A., Dunning, S.P., Bunn, H.F. (1988). Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science.* 242, 1412-1415.

Guillemin, K., Krasnow, M.A. (1997). The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell.* 89, 9-12.

Hammond, S.M., Caudy, A.A., Hannon, G.J. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat. Rev. Genet.* 2, 110-119.

Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M.T., Babaie, E., Prydz, H. (2002). Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res.* 30, 1757-1766.

Howard, L.S., Crosby, A., Vaughan, P., Sobolewski, A., Southwood, M., Foster, M.L., Chilvers, E.R., Morrell, N.W. (2012). Distinct responses to hypoxia in subpopulations of distal pulmonary artery cells contribute to pulmonary vascular remodeling in emphysema. *Pulm. Circ.* 2, 241-249.

Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., Bunn, H.F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7987-7992.

Hutvagner, G., Zamore, P.D. (2002). RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 225-232.

Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y., Semenza, G.L. (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 12, 149-162.

Jackson, A.L., Bartz, S.R., Schelter, J., Kobayashi, S.V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., Linsley, P.S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* 21, 635-637.

Jensen, K.S., Micco, A.J., Czartolomna, J., Latham, L., Voelkel, N.F. (1992). Rapid onset of hypoxic vasoconstriction in isolated lungs. *J. Appl. Physiol.* 72, 2018-2023.

Kallio, P.J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H., Poellinger, L. (1998). Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J.* 17, 6573-6586.

Kallio, P.J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J., Poellinger, L. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 5667-5672.

Kallio, P.J., Wilson, W.J., O'Brien, S., Makino, Y., Poellinger, L. (1999). Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 6519-6525.

Kamlah, F. In vivo siRNA-Transfektion der Lunge und des Bronchialkarzinoms zur Analyse der Hypoxie-induzierbaren Faktoren in der Tumorprogression. 2007. Dissertation.

Kim, Y.M., Barnes, E.A., Alvira, C.M., Ying, L., Reddy, S., Cornfield, D.N. (2013). Hypoxia-inducible factor-1 α in pulmonary artery smooth muscle cells lowers vascular tone by decreasing Myosin light chain phosphorylation. *Circ. Res.* 112, 1230-1233.

Krick, S., Hanze, J., Eul, B., Savai, R., Seay, U., Grimminger, F., Lohmeyer, J., Klepetko, W., Seeger, W., Rose, F. (2005). Hypoxia-driven proliferation of human pulmonary artery fibroblasts: cross-talk between HIF-1alpha and an autocrine angiotensin system. *FASEB J.* 19, 857-859.

Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P.C., Semenza, G.L. (2001). HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol. Cell Biol.* 21, 3995-4004.

- Lee, S.D., Shroyer, K.R., Markham, N.E., Cool, C.D., Voelkel, N.F., Tudor, R.M. (1998). Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.* 101, 927-934.
- Lenfant, C. (1976). *Lung Biology in Health and Disease*. (New York-Basel: Marcel Dekker).
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25, 402-408.
- Long, L., MacLean, M.R., Jeffery, T.K., Morecroft, I., Yang, X., Rudarakanchana, N., Southwood, M., James, V., Trembath, R.C., Morrell, N.W. (2006). Serotonin increases susceptibility to pulmonary hypertension in BMPR2-deficient mice. *Circ. Res.* 98, 818-827.
- MacLean, M.R., Deuchar, G.A., Hicks, M.N., Morecroft, I., Shen, S., Sheward, J., Colston, J., Loughlin, L., Nilsen, M., Dempsie, Y., Harmar, A. (2004). Overexpression of the 5-hydroxytryptamine transporter gene: effect on pulmonary hemodynamics and hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 109, 2150-2155.
- Mahon, P.C., Hirota, K., Semenza, G.L. (2001). FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* 15, 2675-2686.
- Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A., Poellinger, L. (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*. 414, 550-554.
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., Ratcliffe, P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 399, 271-275.
- McCarthy, M. (2000). Gene for primary pulmonary hypertension identified. *Lancet*. 356, 489.
- Meister, G., Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 431, 343-349.
- Meyrick, B., Reid, L. (1979). Hypoxia and incorporation of 3H-thymidine by cells of the rat pulmonary arteries and alveolar wall. *Am. J. Pathol.* 96, 51-70.
-

- Michiels, C., De, L.F., Arnould, T., Dieu, M., Remacle, J. (1994). Hypoxia stimulates human endothelial cells to release smooth muscle cell mitogens: role of prostaglandins and bFGF. *Exp. Cell Res.* 213, 43-54.
- Min, B.H., Foster, D.N., Strauch, A.R. (1990). The 5'-flanking region of the mouse vascular smooth muscle alpha-actin gene contains evolutionarily conserved sequence motifs within a functional promoter. *J. Biol. Chem.* 265, 16667-16675.
- Norman, J.T., Clark, I.M., Garcia, P.L. (2000). Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts. *Kidney Int.* 58, 2351-2366.
- Olschewski, H., Seeger, W. (2000). Treatment of pulmonary artery hypertension. *Pneumologie.* 54, 222-224.
- Persengiev, S.P., Zhu, X., Green, M.R. (2004). Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA.* 10, 12-18.
- Pfeifer, M., Blumberg, F.C., Wolf, K., Sandner, P., Elsner, D., Riegger, G.A., Kurtz, A. (1998). Vascular remodeling and growth factor gene expression in the rat lung during hypoxia. *Respir. Physiol.* 111, 201-212.
- Pisarcik, S., Maylor, J., Lu, W., Yun, X., Undem, C., Sylvester, J.T., Semenza, G.L., Shimoda, L.A. (2013). Activation of hypoxia-inducible factor-1 in pulmonary arterial smooth muscle cells by endothelin-1. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 304, 549-561.
- Post, J.M., Hume, J.R., Archer, S.L., Weir, E.K. (1992). Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am. J. Physiol.* 262, 882-890.
- Richard, D.E., Berra, E., Gothie, E., Roux, D., Pouyssegur, J. (1999). p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J. Biol. Chem.* 274, 32631-32637.
- Rose, F., Grimminger, F., Appel, J., Heller, M., Pies, V., Weissmann, N., Fink, L., Schmidt, S., Krick, S., Camenisch, G., Gassmann, M., Seeger, W., Hanze, J. (2002). Hypoxic pulmonary artery fibroblasts trigger proliferation of vascular smooth muscle cells: role of hypoxia-inducible transcription factors. *FASEB J.* 16, 1660-1661.
-

- Salceda, S., Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* 272, 22642-22647.
- Sartore, S., Chiavegato, A., Faggin, E., Franch, R., Puato, M., Ausoni, S., Pauletto, P. (2001). Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ. Res.* 89, 1111-1121.
- Semenza, G.L. (2002). Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Pharmacol.* 64, 993-998.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 3, 721-732.
- Semenza, G.L. (2004). O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. *J. Appl. Physiol.* 96, 1173-1177.
- Semenza, G.L., Koury, S.T., Nejfelt, M.K., Gearhart, J.D., Antonarakis, S.E. (1991). Cell-type-specific and hypoxia-inducible expression of the human erythropoietin gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 8725-8729.
- Semizarov, D., Frost, L., Sarthy, A., Kroeger, P., Halbert, D.N., Fesik, S.W. (2003). Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 6347-6352.
- Sharp, P.A. (2001). RNA interference--2001. *Genes Dev.* 15, 485-490.
- Shimoda, L.A., Manalo, D.J., Sham, J.S., Semenza, G.L., Sylvester, J.T. (2001). Partial HIF-1 α deficiency impairs pulmonary arterial myocyte electrophysiological responses to hypoxia. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* 281, 202-208.
- Short, M., Nemenoff, R.A., Zawada, W.M., Stenmark, K.R., Das, M. (2004). Hypoxia induces differentiation of pulmonary artery adventitial fibroblasts into myofibroblasts. *Am. J. Physiol Cell Physiol.* 286, 416-425.
- Simonneau, G., Robbins, I., Beghetti, M., Channick, R.N., Delcroix, M., Denton, C.P., Elliott, C.G., Gaine, S., Gladwin, M.T., Jing, Z.C., Krowka, M.J., Langleben, D., Nakanishi, N., Souza, R. (2009). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54, 43-54.
-

Sledz, C.A., Holko, M., De Veer, M.J., Silverman, R.H., Williams, B.R. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat. Cell Biol.* 5, 834-839.

Sobin, S.S., Tremer, H.M., Hardy, J.D., Chiodi, H.P. (1983). Changes in arteriole in acute and chronic hypoxic pulmonary hypertension and recovery in rat. *J. Appl. Physiol.* 55, 1445-1455.

Song, E., Lee, S.K., Wang, J., Ince, N., Ouyang, N., Min, J., Chen, J., Shankar, P., Lieberman, J. (2003). RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat. Med.* 9, 347-351.

Sowter, H.M., Raval, R.R., Moore, J.W., Ratcliffe, P.J., Harris, A.L. (2003). Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1alpha versus Hif-2alpha in regulation of the transcriptional response to hypoxia. *Cancer Res.* 63, 6130-6134.

Stenmark, K.R., Bouchev, D., Nemenoff, R., Dempsey, E.C., Das, M. (2000). Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: contribution of the adventitial fibroblasts. *Physiol Res.* 49, 503-517.

Stenmark, K.R., Davie, N., Frid, M., Gerasimovskaya, E., Das, M. (2006). Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology (Bethesda).* 21, 134-45.

Stenmark, K.R., Fagan, K.A., Frid, M.G. (2006). Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ. Res.* 99, 675-691.

Stenmark, K.R., Frid, M., Nemenoff, R., Dempsey, E.C., and Das, M. (1999). Hypoxia induces cell-specific changes in gene expression in vascular wall cells: implications for pulmonary hypertension. *Adv. Exp. Med. Biol.* 474, 231-258.

Stenmark, K.R., Mecham, R.P. (1997). Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 89-144.

Stenmark, K.R., Yeager, M.E., El Kasmi, K.C., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E.V., Li, M., Riddle, S.R., Frid, M.G. (2013). The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annu Rev Physiol.* 75, 23-47.

Takahashi, R., Kobayashi, C., Kondo, Y., Nakatani, Y., Kudo, I., Kunitomo, M., Imura, N., Hara, S. (2004). Subcellular localization and regulation of hypoxia-inducible factor-2alpha in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 84-91.

Tian, H., McKnight, S.L., Russell, D.W. (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 11, 72-82.

Tuder, R.M., Chacon, M., Alger, L., Wang, J., Taraseviciene-Stewart, L., Kasahara, Y., Cool, C.D., Bishop, A.E., Geraci, M., Semenza, G.L., Yacoub, M., Polak, J.M., Voelkel, N.F. (2001). Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J. Pathol.* 195, 367-374.

Uchida, T., Rossignol, F., Matthay, M.A., Mounier, R., Couette, S., Clottes, E., Clerici, C. (2004). Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1 α . *J. Biol. Chem.* 279, 14871-14878.

Wagenvoort, C.A. (1960). Vasoconstriction and medial hypertrophy in pulmonary hypertension. *Circulation.* 22, 535-546.

Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5510-5514.

Warnecke, C., Zaborowska, Z., Kurreck, J., Erdmann, V.A., Frei, U., Wiesener, M., Eckardt, K.U. (2004). Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 α target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J.* 18, 1462-1464.

Waterhouse, P.M., Wang, M.B., Lough, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature.* 411, 834-842.

Welsh, D.J., Peacock, A.J., MacLean, M., Harnett, M. (2001). Chronic hypoxia induces constitutive p38 mitogen-activated protein kinase activity that correlates with enhanced cellular proliferation in fibroblasts from rat pulmonary but not systemic arteries. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 164, 282-289.

Wenger, R.H., Kvietikova, I., Rolfs, A., Gassmann, M., Marti, H.H. (1997). Hypoxia-inducible factor-1 α is regulated at the post-mRNA level. *Kidney Int.* 51, 560-563.

Wenger, R.H., Stiehl, D.P., Camenisch, G. (2005). Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci. STKE.* 306, re12.

Wiesener, M.S., Turley, H., Allen, W.E., Willam, C., Eckardt, K.U., Talks, K.L., Wood, S.M., Gatter, K.C., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Maxwell, P.H. (1998). Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood*. 92, 2260-2268.

Wort, S.J., Woods, M., Warner, T.D., Evans, T.W., Mitchell, J.A. (2001). Endogenously released endothelin-1 from human pulmonary artery smooth muscle promotes cellular proliferation: relevance to pathogenesis of pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 104-110.

Yu, A.Y., Shimoda, L.A., Iyer, N.V., Huso, D.L., Sun, X., McWilliams, R., Beaty, T., Sham, J.S., Wiener, C.M., Sylvester, J.T., Semenza, G.L. (1999). Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha. *J. Clin. Invest.* 103, 691-696.

9. ANHANG

9.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-HT-Rezeptor	5-Hydroxytryptamin
$[Ca^{++}]_i$	intrazelluläre Ca^{++}
α SMA	alpha-smooth-muscle-cell Aktin
AHR	Aryl Hydrokarbon Rezeptor
AKT	Proteinkinase B
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BMPR	„Bone Morphogenic Protein“-Rezeptor
bFGF	basischer Fibroblastenwachstumsfaktor; basic fibroblast growth factor
bHLH	basic Helix loop Helix
CMV	Zytomegalievirus
DNA	deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang DNA
dsRNA	Doppelstrang RNA
EPO	Erythropoetin
ERK	extracellular signal-related kinases
ET-1	Endothelin 1
FIH-1	factor inhibiting HIF-1
FPAH	Familiäre Pulmonalerterielle Hypertonie
GFP	green fluorescent protein

HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HPV	hypoxische Vasokonstriktion
HRE	Hypoxie-responsives Element
IPAH	Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
KDR	200kDa <u>k</u> inase <u>i</u> nsert <u>d</u> omain-containing <u>r</u> eceptor, VEGF-Rezeptor-2 (Mensch)
kPa	Kilopascal
Kv	Spannungsabhängige Kaliumkanäle
MAPK	mitogen activated protein kinase
MCS	multiple cloning site
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mRNA	Messenger RNA
PA-EC	pulmonalarterielle Endothelzelle
PA-FB	pulmonalarterielle Fibroblasten
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PAMP	pulmonalarterieller Mitteldruck
PAS	P er – (period circadian protein) A rnt – (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein) S im –(single-minded protein)
PA-SMC	pulmonalarterielle glatte (smooth) Muskelzellen (m uscle c ells)
PDGF	Plättchenwachstumsfaktor; platelet derived growth factor
PH	pulmonale Hypertonie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PPH	primäre pulmonale Hypertonie

ODDD	oxygen-dependent degradation (ODD) domain
pVHL	von Hippel-Lindau Tumor Suppressor
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interferenz
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
SDS PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering RNA
TAD	transactivation domain
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor- β ; <i>transforming growth factor-β</i>
VEGF	vascular endothelial growth factor

9.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Schematische Darstellung von HIF-1α, HIF-2α und ARNT.....</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 2: Die Regulation von HIF-1α.....</i>	<i>20</i>
<i>Abbildung 3: Hypoxie induzierte Genregulation durch HIF-1α.....</i>	<i>22</i>
<i>Abbildung 4: HIF in der physiologischen Antwort der pulmonalen Arteriolen unter chronischer Hypoxie</i>	<i>25</i>
<i>Abbildung 5: Prinzip der siRNA Funktionsweise</i>	<i>27</i>
<i>Abbildung 6: Übersicht der durchgeführten Untersuchungen</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 7: Schematische Darstellung der modifizierten Boyden Kammer zur Untersuchung der Migration PA-FB</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 8: Flussdiagramm der durchgeführten Untersuchungen.</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 9: Inhibition des Luciferase Proteins mittels siRNA gegen Luciferase mit Titration und Analyse der Zeitkinetik.....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 10: Nachweis der HIF-1α Inhibition auf mRNA Ebene.....</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 11: Nachweis der HIF-1α Inhibition auf Protein Ebene.....</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 12: Zeitkinetik der HIF-1α Inhibition</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 13: Die Inhibition von HIF-1α verhindert die transkriptionelle Aktivierung und damit die Expression HIF-1α abhängiger Zielgene.....</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 14: Auswirkung von Hypoxie auf die Proliferation von A549 Zellen.</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 15: Änderung in der Zellzyklusphase durch die Inhibition von HIF-1α.....</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 16: Mittelwerte der Zellzyklusanalyse von A549 Zellen mit und ohne Transfektion mit siRNA.</i>	<i>61</i>
<i>Abbildung 17: Proliferation PA-FB unter Hypoxie.</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 18: Hypoxie führt zu einer Reduktion der Apoptose in PA-FB.....</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 19: : Migration PA-FB unter Hypoxie.....</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 20: Transdifferenzierung der PA-FB unter Hypoxie.</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 21: Induktion der Transdifferenzierung von PA- FB.</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 22: Expression von HIF-1α und HIF-2α auf Proteinebene in PA-FB.....</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 23: mRNA Expression von HIF Zielgenen in Normoxie und Hypoxie.....</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 24: : Spezifische Inhibition von HIF-1α und HIF-2α in PA-FB auf mRNA- und Protein-Ebene.</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 25: Inhibition der mRNA Expression von HIF Zielgenen durch siRNA.</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 26: Proliferation PA-FB unter der Inhibition von HIF-1α und HIF-2α</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 27: Migration PA-FB unter der Inhibition von HIF-1α und HIF-2α</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 28: Die Expression von alpha-Smooth-Muscle-Cell Aktin unter den Inhibition von Hif-1α und Hif-2α.....</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 29: Schematische Darstellung des vaskulären Remodellings in pulmonalarteriellen Fibroblasten.</i>	<i>80</i>
<i>Abbildung 30: Schematische Darstellung des vaskulären Remodellings in pulmonalarteriellen Fibroblasten modifiziert nach Semenza 2002.</i>	<i>84</i>
<i>Abbildung 31: Transfektion der gesunden Lunge über den implantierten Rechtsherzkatheter mit siRNA-Cy3 und in vivo jetPEI™.....</i>	<i>89</i>
<i>Abbildung 32: Transfektion des Lewis-Lung-Karzinoms der Lunge über den implantierten Rechtsherzkatheter mit siRNA-Cy3 und Lipofectamine™ 2000.....</i>	<i>90</i>

9.3 TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Dana Klassifikation 2008</i>	<i>11</i>
<i>Tabelle 2: Lipofectamine™ 2000 Protokoll für die Transfektion auf 6 well Kulturplatten</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 3: Oligofectamine™ Transfektionsprotokoll für 6 well Kulturgefüße.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten siRNAs</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 5: Mastermix für die Reverse Transkription Kalkulation je RNA-Probe</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 6: Verwendete Primer</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 7: Für Western Blot Analysen verwendete Antikörper.....</i>	<i>47</i>

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

9.5 EIGENE ORIGINALARBEITEN

1. Olschewski A, Li Y, Tang B, Hanze J, **Eul B**, Bohle RM et al. Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 2006; 98: 1072-80.
 2. **Eul B**, Rose F, Krick S, Savai R, Goyal P, Klepetko W et al. Impact of HIF-1alpha and HIF-2alpha on proliferation and migration of human pulmonary artery fibroblasts in hypoxia. *FASEB J* 2006; 20: 163-5.
 3. Savai R, Wolf JC, Greschus S, **Eul BG**, Schermuly RT, Hanze J et al. Analysis of tumor vessel supply in Lewis lung carcinoma in mice by fluorescent microsphere distribution and imaging with micro- and flat-panel computed tomography. *Am J Pathol* 2005; 167: 937-46.
 4. Savai R, Schermuly RT, Voswinckel R, Renigunta A, Reichmann B, **Eul B** et al. HIF-1alpha attenuates tumor growth in spite of augmented vascularization in an A549 adenocarcinoma mouse model. *Int J Oncol* 2005; 27: 393-400.
 5. Krick S, **Eul BG**, Hanze J, Savai R, Grimminger F, Seeger W et al. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32: 395-403.
 6. Krick S, Hanze J, **Eul B**, Savai R, Seay U, Grimminger F et al. Hypoxia-driven proliferation of human pulmonary artery fibroblasts: cross-talk between HIF-1alpha and an autocrine angiotensin system. *FASEB J* 2005; 19: 857-9.
 7. Hanze J, **Eul BG**, Savai R, Krick S, Goyal P, Grimminger F et al. RNA interference for HIF-1alpha inhibits its downstream signalling and affects cellular proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312: 571-7.
-

9.6 KONGRESSBEITRÄGE

Freie Vorträge:

Deutsche Gesellschaft für Pneumologie 2006: B. Eul, F. Kamlah, W. Seeger, F. Grimminger, J. Hänze, F. Rose „*Rolle von HIF für die Therapie Resistenz gegenüber Cisplatin an Adenokarzinoma (A549) Zellen in Normoxie und Hypoxie*“

Deutsche Gesellschaft für Pneumologie 2005: F. Rose, B. Eul, R. Savai, P. Goyal, S. Krick, F. Grimminger, W. Seeger, J. Hänze „*Sequenzspezifische Suppression Hypoxie-induzierbarer Transkriptionsfaktoren (HIFs) und stabil transfizierter Luciferase durch RNA interference in vitro und in vivo*“

Deutsche Gesellschaft für Pneumologie 2004: B. Eul, F. Rose, R. Savai, P. Goyal, S. Krick, W. Kummer, F. Grimminger, W. Seeger, J. Hänze. „*Suppression des Transkriptionsfaktors HIF-1a durch RNA interference: Effekte auf Zielgene und Zellproliferation in A549 Zellen*“

Posterbeiträge:

Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin 2006: B. Eul, F. Kamlah, O. Riedmaier, T. Dold, F. Grimminger, R. Engenhardt-C., W. Seeger, J. Hänze und F. Rose „*HIF-2 beeinflusst die Wirkung von Cisplatin in Adenokarzinoma (A549) Zellen in vitro*“

Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin 2005: B. Eul, S. Krick, F. Kamlah, J. Kern, W. Seeger and F. Rose. „*Die Hypoxie induzierten Faktoren (HIF) bestimmen die Rolle der pulmonalarteriellen Fibroblasten im Hypoxie induzierten vaskulären Remodelling*“
Young investigator award session

Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin 2004: B. Eul*, R. Savai, S. Krick*, P. Goyal*, F. Grimminger, W. Seeger, F. Rose and J. Hänze „*Suppression des Transkriptionsfaktors HIF-1a durch RNA interference: Effekte auf Zielgene und Zellproliferation in A549 Zellen*“

9.7 DANKSAGUNG

Bei allen, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich auf diese Weise herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Werner Seeger danke ich für eine interessante Fragestellung, die ich sowohl unter seiner Betreuung als auch mit der fachkundigen Unterstützung von Prof. Dr. Dr. Friedrich Grimminger bearbeiten durfte. Hierbei bekam ich die Möglichkeit, äußerst eigenständig zu arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt meinen beiden Betreuern:

Herrn PD Dr. Jörg Hänze da er mich als voll integriertes Mitglied in seinem Forscherteam akzeptierte und mich die Faszination an der molekularbiologischen Forschung lehrte.

Herrn PD Dr. Frank Rose, der mir ermöglichte, die Bearbeitung meines Dissertationsthemas in seiner Arbeitsgruppe intensiv durchzuführen und mich an die Verwirklichung eigener Ideen und Konzepte heranführte.

Beiden Betreuern gilt besonderen Dank für die Fortführung der Unterstützung auch nach Abschluss der Dissertation.



9 783596 1203

Photo cover: © abhijith3747 - Fotolia.com